

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Vendula Kuntová

Příprava a charakterizace nových analogů insulinu s triazolovým můstkem v C-konci
řetězce B

*Synthesis and characterization of new insulin analogs with a triazole bridge at the
C-terminus of the B chain*

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21. 5. 2018

Vendula Kuntová

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který této práci věnoval. Poděkování patří také celému kolektivu za skupiny Dr. Jiráčka na UOCHB AV ČR za pomoc a rady hlavně v experimentální části a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Insulin je peptidový hormon nezbytný k udržení stálé hladiny glukózy v krvi. V lidském těle interaguje s dvěma isoformami receptoru, IR-A a IR-B. Tyto receptory se liší především tkáňovou distribucí v organismu, přičemž IR-A má spíše funkci mitogenní, kdežto IR-B metabolickou. Cílem této práce bylo vytvořit analog insulínu, který bude selektivní k IR-B. Připravili jsme tři nové analogy insulínu s triazolovým můstkem v pozicích B26 a B29. 1,2,3-triazolová skupina byla připravena cykloadiční reakcí katalyzovanou ionty Cu(I) mezi postranními řetězci kyseliny azidopentanové (N₃Pent) v pozici B26 a propargylglycinu (Prg) v pozici B29. Analogy se navzájem lišily konfigurací atomů C α nepřirozených aminokyselin v polohách B26 a B29. Konkrétně jsme připravili analog **1** s D-N₃PentB26 a D-PrgB29, analog **2** s D-N₃PentB26 a L-PrgB29 a analog **3** s L-N₃PentB26 a D-PrgB29. Nové analogy byly testovány pro vazbu vůči oběma isoformám receptoru insulínu (IR-A a IR-B). Analogy **1** a **2** byly oba slabší ve vazbě než lidský insulin a nevykazovaly selektivitu pro žádnou z isoform. Analog **3** byl 4x silnější ve vazbě na IR-B a 2x silnější ve vazbě na IR-A než lidský insulin. Avšak vazebná selektivita tohoto analogu vůči IR-B (asi 2x) byla nižší než selektivita (asi 2,6x) jeho diastereoisomeru s L-N₃PentB26 a L-PrgB29 připraveného v předchozí studii (Viková et al, Sci. Rep. 2016, **6**, 19431). I když jsme nezískali analog více selektivní vůči IR-B než ten, který byl připraven dříve, naše nová data mohou být cenná pro vývoj nových analogů insulínu s potenciálním využitím pro léčbu diabetu.

Klíčová slova: insulin, analog, klik chemie, syntéza, receptor insulínu, izoforma receptoru

Abstract

Insulin is a peptide hormone responsible for maintaining glucose homeostasis in the circulation. Insulin interacts with two isoforms of the insulin receptor, IR-A and IR-B, which have different tissue distribution. IR-A is supposed to have rather mitogenic function and IR-B rather metabolic function. The goal of this study was to develop insulin analog, which will be more selective for IR-B than human insulin. We prepared three new insulin analogs with a 1,2,3-triazole bridge at the positions B26 and B29. The triazole bridge was formed by Cu(I)-catalysed cycloaddition between side chains of azidopentanoic acid (N₃Pent) at B26 and propargylglycine (Prg) at B29. The analogs differed in configurations on C α carbons of unusual amino acids at the positions B26 and B29. Specifically, we prepared insulin analog **1** with D-N₃PentB26 and D-PrgB29, insulin analog **2** with D-N₃PentB26 and L-PrgB29 and insulin analog **3** with L-N₃PentB26 and D-PrgB29. New analogs were tested for their binding to both isoforms (IR-A and IR-B) of the insulin receptor. Analogs **1** and **2** were less potent in binding than human insulin and had no selectivity for receptor isoforms. Analog **3** was 4-times more potent in binding to IR-B and 2-times more potent in binding to IR-A than human insulin. However, the binding selectivity of the analog **3** for IR-B (about 2-fold) was lower than that of L-N₃PentB26 and L-PrgB29 diastereoisomer (about 2.6-fold) prepared in the preceding study (Viková et al, Sci. Rep. 2016, **6**, 19431). Despite that we have not discovered more IR-B-specific analog than obtained previously, the new data can be useful for design of new more IR-B specific insulins, which could find application in treatment of diabetes.

Key words: insulin, analog, click chemistry, synthesis, insulin receptor, receptor isoform

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
1.1 Insulin	10
1.2 Insulinové receptory	12
1.3 Interakce insulínu s IR	14
1.4 Analogy insulínu	17
2 Cíl práce	20
3 Materiál	21
4 Metody	23
4.1 Příprava des(B23-B30)-insulínu (DOI)	23
4.2 Syntéza oktapeptidů	23
4.2.1 Syntéza peptidu 1	23
4.3 Cyklizace oktapeptidů	24
4.4 Enzymová semisyntéza	25
4.4.1 Enzymatická semisyntéza analogu 1	25
4.4.2 Enzymatická semisyntéza analogů 2 a 3	26
4.5 Vazebné testy	26
4.5.1 Příprava roztoků analogů	27
4.5.2 Příprava buněk IR-A	27
4.5.3 Testování s receptorem IR-A	27
4.5.4 Příprava buněk IR-B	28
4.5.5 Testování IR-B	28
5 Výsledky	30
5.1 Syntéza oktapeptidů	30
5.2 Cyklizace oktapeptidů	32
5.3 Enzymová semisyntéza	34
5.4 Vazebné testy	38
6 Diskuze	42

7	Závěr	46
	Seznam literatury.....	47

Seznam použitých zkratk

ACN – acetonitril

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. *bovine serum albumin*)

DBU – 1,8-diazobicykloundekan

DCM – dichlormethan

DIC – N,N-diisopropylkarbodiimid

DM – diabetes mellitus

DM1 – diabetes mellitus 1. typu

DM2 – diabetes mellitus 2. typu

DMA – dimethylacetamid

DMF – dimethylformamid

DOI – des(B23-B30)oktapeptid insulin

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

F-moc – 9-fluorenylmethyloxykarbonylová skupina

GLUT-4 – glukosový transportér typu 4

HAc – kyselina octová

HOBT – 1-hydroxybenzotriazol

IGF-2 – insulinu podobný růstový faktor (z angl. *insuline-like growth factor 2*)

IR – insulinový receptor

IR-A – insulinový receptor typu A

IR-B – insulinový receptor typu B

IUB – Mezinárodní unie pro biochemii (z angl. *International Union of Biochemistry*)

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

K_d – disociační konstanta

L-N₃Pent – L-azidopentanová kyselina

L-Prg – L-propargylglycin

MODY – diabetes typu dospělých vyskytující se u mladistvých (z angl. *maturity onset diabetes of young*)

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (z angl. *reverse phase-high performance liquid chromatography*)

s.c. – podkožní

tBut – terciální butanol

TFA – trifluoroctová kyselina

TIS - triisopropylsilan

Tris – tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

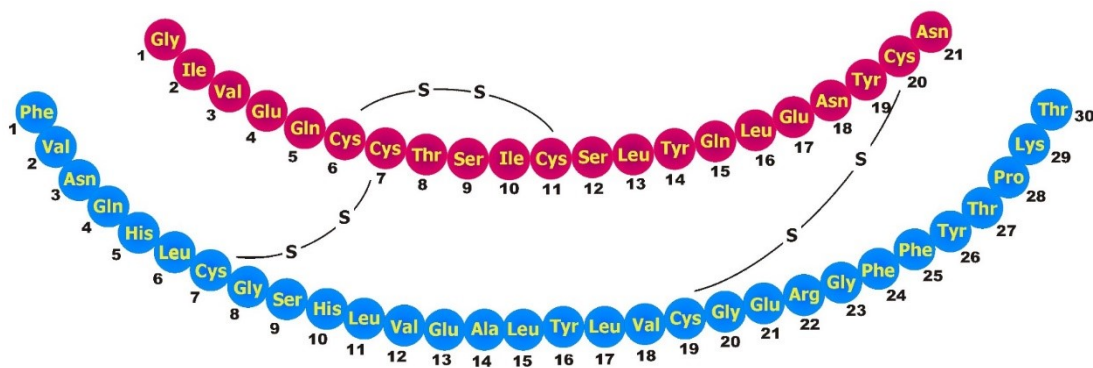
Dále jsou využívány jednopísmenné a třípísmenné zkratky podle doporučení IUPAC-IUB [1]. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě.

1 Úvod

1.1 Insulin

Insulin je polypeptidový hormon, který byl poprvé purifikován a klinicky použit v roce 1921 [2]. K dalšímu výraznému mezníku došlo v roce 1959, kdy se F. Sangerovi jako prvnímu podařilo popsat jeho primární strukturu [3]. Trojrozměrnou strukturu se pomocí metody difrakce rentgenového záření v krystalu se podařilo Dorothy Hodgkinové vyřešit v roce 1969 [4].

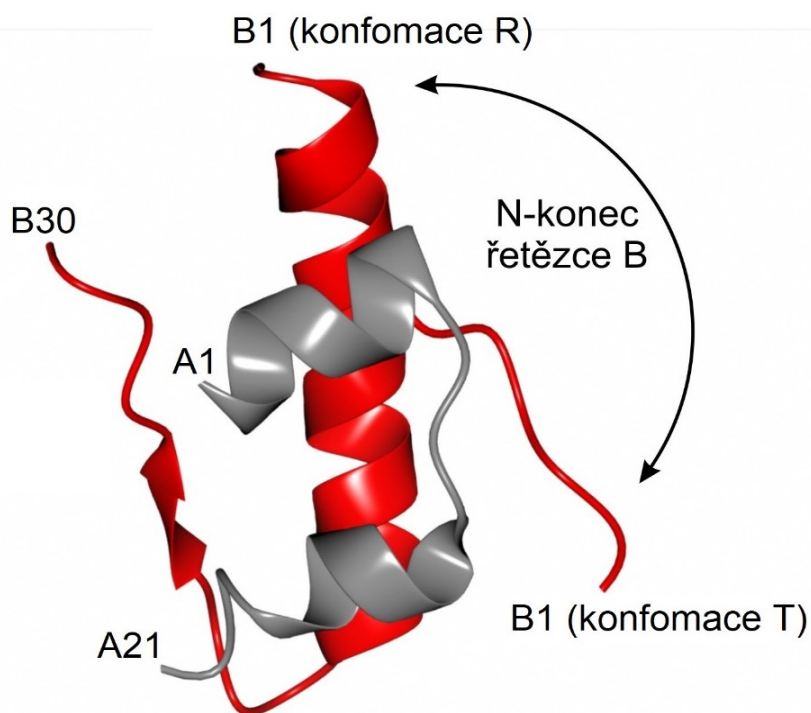
Hormon insulin se skládá celkem z 51 aminokyselin, které jsou rozděleny do dvou řetězců. Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin, řetězec B je tvořen 30 aminokyselinami. Součástí této molekuly jsou také tři disulfidické můstky; dva spojují oba řetězce v polohách CysA7 a CysB7, respektive CysA20 a CysB19, třetí se nachází uvnitř řetězce A a spojuje CysA6 a CysA11. Primární struktura insulinu je přehledně znázorněna na následujícím obrázku 1.



Obrázek 1. Primární struktura lidského insulinu. Řetězec A je označen červeně, řetězec B modře. Převzato z [5].

Sekundární struktura insulinu obsahuje různé strukturní motivy; α -šroubovici, β -otáčku i β -skládaný list. Jsou zde ale také neuspořádané úseky. Na A řetězci rozlišujeme tři hlavní úseky, dvě α -šroubovice v polohách A1-A7 a A12-A17 a jednu β -otáčku, která se nachází mezi nimi (A8-A11). N-konec řetězce A, tedy A19-A21 má strukturu nataženého řetězce. Na řetězci B také rozlišujeme tři hlavní úseky, jejichž konformace závisí na tom, jestli se insulin nachází v tzv. stavu R („relaxed“) nebo stavu T („tense“). Ve stavu R je to α -šroubovice, která je v celém úseku B1-B19. Ve stavu T je šroubovice pouze v poloze B9-B19, přičemž pozice B1-B8 má v tomto stavu konformaci nataženého řetězce následujícího po otočce v poloze B8. Za α -šroubovici

poté následují β -otočky v polohách B20-B23. C-konec B řetězce potom tvoří strukturu β -listu [6]. Spojené řetězce A a B navzájem vytvářejí terciální strukturu insulinu (obrázek 2).



Obrázek 2. Terciální konformace lidského insulinu. Řetězec A je vyznačen šedě, řetězec B červeně. Obě alternativní konformace N-konce řetězce B jsou ukázány jako konformace R či T. Disulfidické můstky nejsou vyznačeny. Vytvořila Dr. Lenka Žáková z týmu Dr. Jiráčka.

V lidském organismu je insulin tvořen B-buňkami (někde nazývané β -buňky) Langerhansových ostrůvků pankreatu. Nejprve vznikne preproinsulin, ze kterého následně odštěpením krátkého řetězce vzniká proinsulin. Proinsulin je jednořetězcový peptid se stejnými třemi disulfidickými můstky jako v insulinu. Po sekrečním podnětu působením dvou endopeptidáz (typ I a II) dojde k odštěpení C-peptidu a vznikne finální dvouřetězcová molekula insulinu [7; 8].

V krvi se insulin vyskytuje při koncentracích v rozmezí 10^{-11} a 10^{-9} mol·l⁻¹ ve kterých je přítomný ve formě monomeru. Pouze monomer insulinu zaručuje biologickou aktivitu při kontaktu s insulinovým receptorem. Při vyšších koncentracích než 10^{-5} mol·l⁻¹ se insulin vyskytuje převážně ve formě dimeru. Pokud je pH neutrální a jsou přítomny ionty Zn²⁺, tak dimery agregují do formy hexamerů. Hexamer se dvěma ionty Zn²⁺ je biologicky významný, jelikož v této formě je insulin pravděpodobně ukládán v pankreatu v zásobních granulech B-buněk [6].

Insulin je hormon udržující stálou hladinu glukózy v krvi. Při jeho nedostatku vzniká onemocnění diabetes mellitus (DM), jehož incidence se v posledních dvou desetiletích značně zvyšuje. DM se klasifikuje do čtyř kategorií, diabetes mellitus 1. typu (DM1), diabetes mellitus 2. typu (DM2), gestační diabetes mellitus a ostatní specifické typy. Mezi ostatní typy DM se řadí především sekundární typy diabetu, tedy ty, které vznikají při chorobách zevní části slinivky břišní a při endokrinopatiích. Dále sem patří také MODY („maturity onset diabetes of young“), což je diabetes mellitus zapříčiněný většinou mutacemi v sekvenci insulinu či jeho prekursorů. Nejrozšířenějšími typy jsou DM1 a DM2. DM1 je způsoben nedostatečnou endogenní produkcí insulinu, která je snížena či úplně vymizí kvůli autoimunitní destrukci B-buněk pankreatu a nemoc nastupuje zejména u dětí a mladších jedinců. Příčiny jeho vzniku nejsou stále jasné, ale důležité budou pravděpodobně genetické vlivy a vlivy vnějšího prostředí. Léčba tohoto typu diabetu je insulin-dependentní, tedy naprosto závislá na vnějším dodávání insulinu. DM2 vzniká zejména díky insulinové rezistenci, tedy snížené citlivosti periferních tkání vůči endogennímu insulinu, a tím insulinovému deficitu, který může být zejména z počátku pouze relativní (produkce insulinu může být ve skutečnosti i zvýšená, tzv. hyperinsulinemie). DM2 se řadí mezi takzvaná civilizační onemocnění a přesné molekulární příčiny jeho vzniku jsou opět nejasné. Nicméně, k jeho propuknutí jsou pravděpodobně opět důležité genetické faktory, ale asi také vlivy vnějšího prostředí. Je ale zcela jistě spojený se starším věkem a zejména s obezitou, která je hlavním spouštěčem DM2, neboť naprostá většina diabetiků DM2 je obézních. Nicméně zdaleka ne všichni obézní lidé trpí DM2. Tento typ diabetu z počátku insulin-dependentní není, ale u některých jedinců (až 20 %) je v pozdější fázi dodávání exogenního insulinu nezbytné. DM2 se často vyvine v DM1 díky destrukci pankreatu v důsledku dlouhodobě zvýšené produkce insulinu [7].

Dalšími onemocněními, která mohou být spojena s insulinem, jsou Alzheimerova choroba (či někdy také tzv. DM3), která velmi pravděpodobně souvisí s insulinovou rezistencí v mozku [9] a dále nádorová onemocnění, při kterých vznikají poruchy vnitrobuněčné signalizace po vazbě insulinu na receptor [10].

1.2 Insulinové receptory

Insulin se v cílových tkáních váže na insulinový receptor (IR), což je transmembránový glykoprotein ze skupiny tyrosinkinasových receptorů. Jeho molekulová hmotnost je 340 kDa a má poločas života asi 7 hodin. Je lokalizován ve všech tkáních v různých koncentracích. Rozlišujeme jeho dvě isoformy, insulinový receptor A (IR-A) a

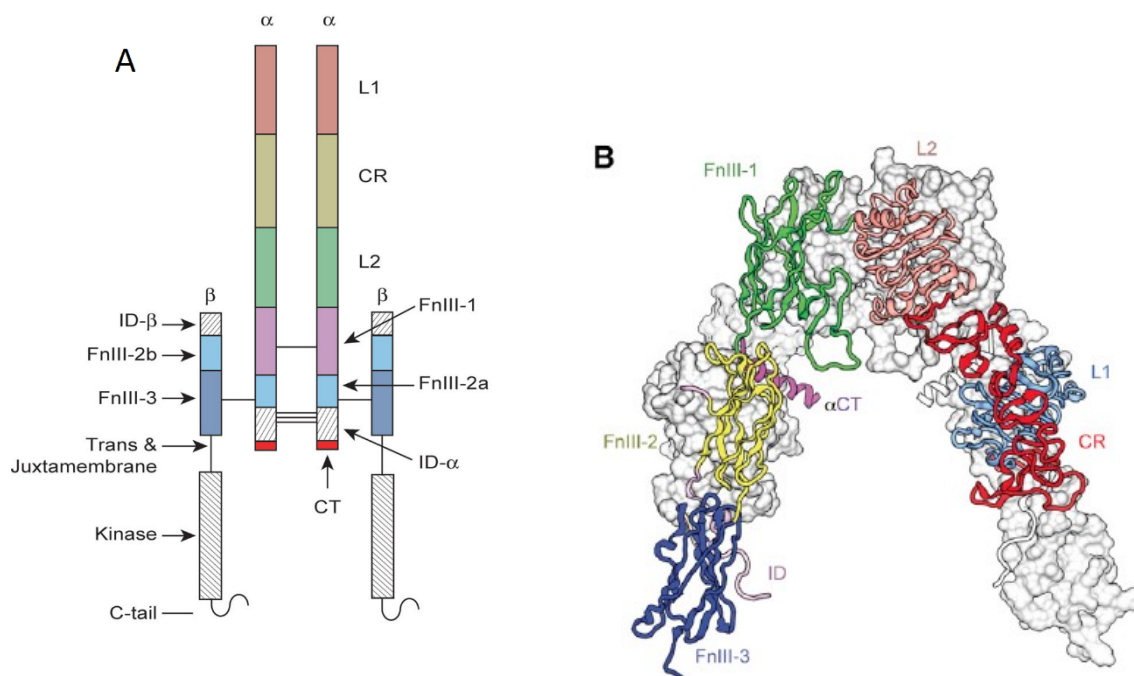
insulinový receptor B (IR-B), které mají rozdílnou distribuci mezi tkáněmi a možná i rozdílnou funkci [11; 12; 13].

Insulinový receptor je homodimer skládající se ze dvou extracelulárních α -podjednotek a dvou částečně extracelulárních, transmembránových a i intracelulárních β -podjednotek (obrázek 3A, strana 14). Jedná se o dva identické α - β monomery, které jsou spojeny pomocí čtyř disulfidických můstků, disulfidický můstek je také mezi α a β podjednotkou. Podjednotka α je od N-konce tvořena doménami bohatými na leucin („leucin rich“, L1 a L2) mezi něž je vložena doména bohatá na cystein („cystein rich“, CR). Poté následují dvě domény podobné fibronektinu (FNIII-1, FNIII-2a a FNIII-3) a poté ještě tzv. vložená doména („insert domain“, ID) na jejímž C-konci je navázaný segment „ α CT“, který je nezbytný pro vazbu na insulin a který vytváří rozdíl mezi IR-A (-12 aminokyselin) a IR-B (+12 aminokyselin). β -podjednotka na svém N-konci pokračuje ID doménou, následovanou FNIII-2b a FNIII-3 doménami. Na doménu FNIII-3 navazuje doména transmembránová (TM), která má tvar α -helixu. Uvnitř buňky následuje tyrosinkinasová doména (TK), na které po vazbě insulinu dochází k autofosforylaci tří tyrosinových zbytků, čímž se spouští kaskáda fosforylačních dějů vedoucí k transportu glukózy dovnitř buňky a i jiným efektům insulinu [11; 12; 14].

Struktura extracelulárních ektodomén IR byla po mnoha letech úsilí vyřešena v roce 2006 [11] a je zobrazena na obrázku 2B na straně 14. Obě α -podjednotky navzájem zaujímají strukturu „obráceného V“.

Jak již bylo dříve uvedeno, existují dva typy insulinových receptorů, IR-A a IR-B. Jedinou odlišností je přítomnost či absence krátké sekvence 12 aminokyselin na C-konci extracelulární α -podjednotky, na místě zvaném α CT segment. U IR-B se tato sekvence 12 aminokyselin nachází, u IR-A nikoliv. Ačkoliv je 12 aminokyselin z celkového počtu, ze kterých se IR skládá (1380 aminokyselin), velmi malé množství, fyziologické důsledky při vazbě s molekulou insulinu či jeho analogu mohou být podstatné. Historicky je IR-B nazýván jako metabolická forma IR a IR-A jako mitogenní forma. Je ovšem nejasné, jestli insulin může aktivovat rozdílné buněčné proteiny pomocí IR-A nebo IR-B. Oba receptory mají totiž také dosti rozdílnou tkáňovou distribuci. IR-B dominuje v jaterních buňkách, kde tvoří více než 90 % a ve svalové a tukové tkáni, kde tvoří přibližně 70 %. Fosforylace TK ve svaletch a tukové tkáni vede k aktivaci GLUT-4 přenašeče, čímž je umožněn vstup glukózy do buňky. V jaterních buňkách GLUT-4 přenašeče přítomny nejsou, buňky ale na insulin reagují jinými mechanismy, například inhibicí enzymů zapojenými do metabolismu glukózy. IR-A se téměř výhradně nachází v ostatních tkáních, patří sem například mozek, lymfatické

tkáně či embryo. Není úplně jasné, z jakého důvodu se v mozku nachází receptory IR-A a ne IR-B, je ale pravděpodobné, že místní IR-A receptory slouží nejen pro insulin, ale také příbuzný IGF-2 (insulin-like growth factor 2), který se na IR-A váže s nanomolární afinitou [13; 15].



Obrázek 3. A. Schématické znázornění podjednotek a primární struktury ($\alpha\beta$)₂ homodimeru IR. Převzato z [29]. B. 3D-struktura extracelulární ektodomény isoformy A insulinového receptoru (isoforma A), vytvářející tzv. "obrácené V" z obou podjednotek. Jeden z monomer je znázorněn barevně a je ukázána doména L1 (světle modrá), CR (červená), L2 (lososová), FNIII-1 (zelená), FNIII-2 (žlutá), FNIII-3 (tmavě modrá) domains. α -CT segment je zobrazen červeně (na 3A) či růžově (na 3B). Druhý monomer je ukázán v šedé pouze jako elektronová hustota. Převzato z [28].

1.3 Interakce insulinu s IR

Insulin je sice jeden z nejstudovanějších hormonů, ale mechanismus jeho interakce s insulinovým receptorem není pořád zcela objasněn. Jak bylo již zmíněno v předchozí kapitole, IR je dimerní, takže obsahuje dvě stejná vazebná místa pro insulin. Efektivně, tzn. při fyziologických koncentracích (< 1 nM) však může IR vázat jen jednu molekulu insulinu. Vazba insulinu na IR totiž vykazuje tzv. negativní kooperativitu způsobenou konformačními změnami ve struktuře receptoru při vazbě insulinu. První molekula insulinu je navázána s vysokou afinitou již při subnanomolárních koncentracích hormonu. Do druhého vazebného místa receptoru se insulin váže jen při vysokých

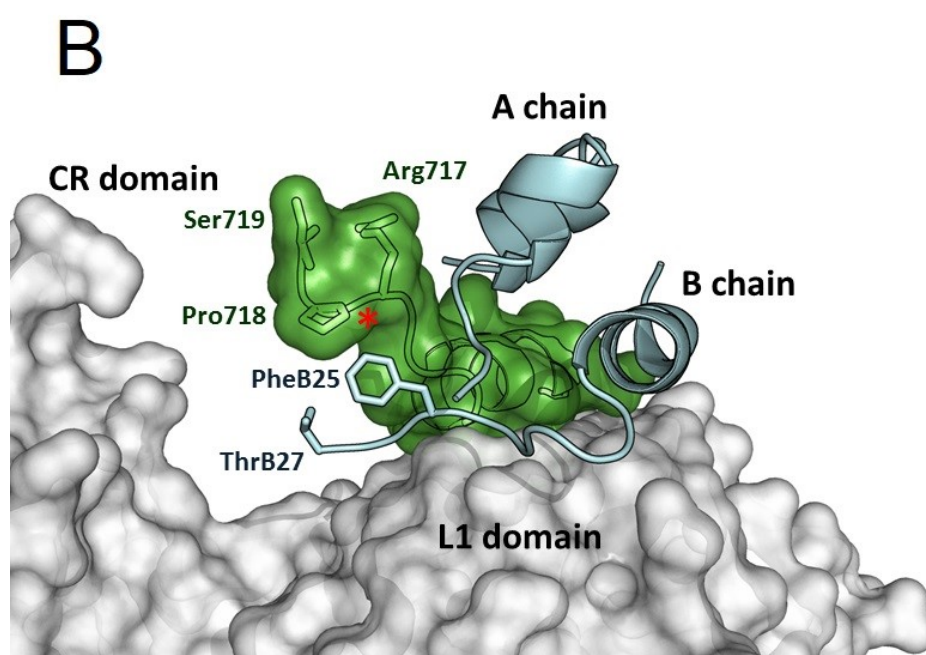
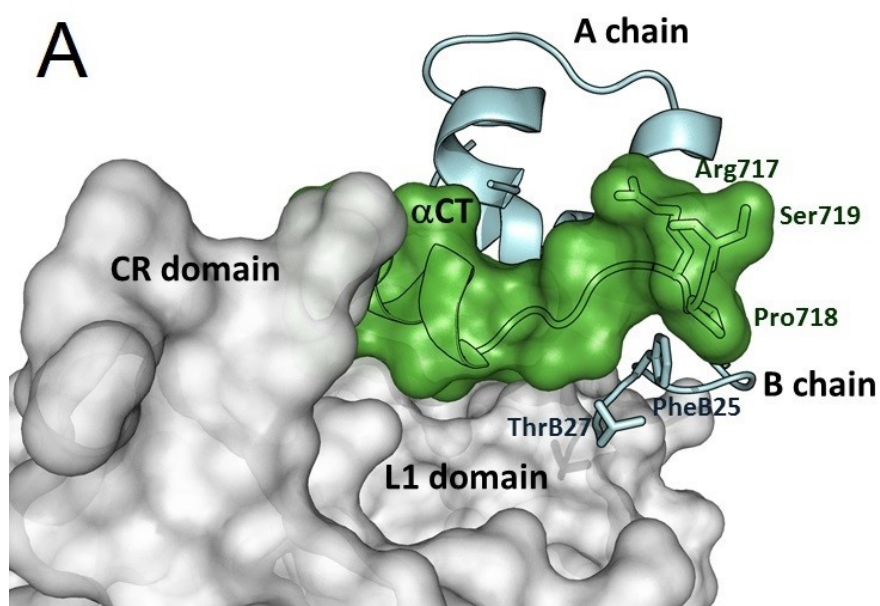
nefyziologických (mikromolárních) koncentracích insulinu a tato vazba pak díky konformační změně receptoru vytlačuje insulin z primárního vazebného místa receptoru. Pro negativní kooperativitu jsou nezbytné aminokyseliny v pozicích A21, B24, B25 a B26 [16].

Důležitým faktem je právě to, že IR podstoupí po prvním kontaktu rozsáhlým konformačním změnám ve své struktuře, které vedou k přiblížení obou TK domén uvnitř buňky, jejich vzájemné autofosforylaci, fosforylaci dalších proteinů a spuštění signalizační kaskády. Přesná strukturní podstata konformační změny vedoucí k tyrosinkinasové aktivaci však stále není vyřešena [17].

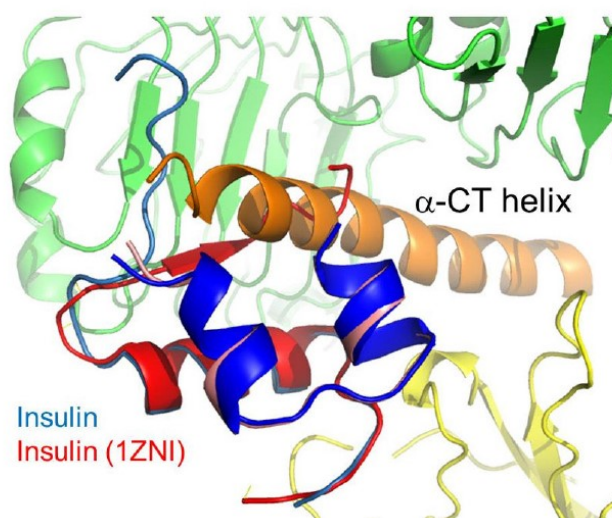
Za pomoci cílené mutagenese insulinu [16] bylo zjištěno, že insulin se na receptor váže dvěma oddělenými místy ve své molekule, tzv. Site 1 a Site 2, které interagují s příslušnými Site 1' a Site 2' receptoru. Site 1 insulinu by mělo zahrnovat aminokyseliny A1-A4, A19, A21, B11, B12, B16 a B24-B26. Site 2 insulinu by mělo být tvořeno pozicemi A8, A10, A12, A13, A17, B10, B13 a B17.

Identita Site 1 insulinu a Site 1' receptoru byla potvrzena až v letech 2013 a 2014 na základě krystalových struktur fragmentu receptoru s insulinem [18; 19] a jejich interakce je ukázána na obrázku 4 na straně 16. Primární kontakt s vazebným místem se zřejmě uskuteční C-koncem B řetězce insulinu, konkrétně aminokyselinami B24-B26. Řetězec C je následně odkloněn od jádra molekuly, díky čemuž dojde k odhalení aminokyselin N-konce řetězce A [18].

Druhé vazebné místo IR (Site 2') není stále dobře definováno, ale předpokládá se, že je pravděpodobně tvořeno FNIII-1 a FNIII-2 doménami α -monomeru IR [18; 20]. Velmi nedávno byla publikována struktura komplexu insulinu s celým receptorem vytvořená za pomoci Cryo-EM techniky [21]. Tato struktura potvrdila poznatky předchozích krystalografických studií o interakci Site 1-Site 1' a poprvé ukázala i interakci Site 2-Site 2'. Ta je překvapivě poměrně omezená a limitovaná u receptoru pouze na FNIII-1 (Site 2') a u insulinu na aminokyseliny A7 a A8 (Site 2) (obrázek 5, strana 17). Tento výsledek je překvapivý a neodpovídá poznatkům o Site 2 získaným z mutací insulinu (viz výše). Je možné, že tato Cryo-EM struktura je ovlivněna zpracováním vzorku a že se v budoucnu dočkáme ještě jiných poznatků.



Obrázek 4. Dva alternativní pohledy na interakci Site 1 insulinu a Site 1' receptoru insulinu (v tomto případě IR-A). CR a L1 domény receptoru jsou vyznačeny šedě, α -CT segment (krátká IR-A forma) je zelený a řetězce insulinu světle tyrkysové. Vyznačeny jsou i postranní řetězce některých aminokyselin důležitých pro interakci. Na panelu A je názorně vidět jak je C konec řetězce B insulinu (B25-B27) částečně překryt C-koncem α -CT segmentu. Na panelu B, červená hvězdička ukazuje, kde by bylo vloženo 12 aminokyselin IR-B. Převzato z [13].



Obrázek 5. Cryo-EM struktura komplexu insulínu a IR-A. Navázaný insulin je modrý a je přeložený se strukturou volného insulínu, který je červený. Rozdíl mezi oběma strukturami je v C-konci řetězce B, který se musí při vazbě na receptor odklonit od centrální části insulínu, aby nedošlo ke střetu s C koncem α -CT segmentu, který je vyznačen oranžově. Site 1' receptoru je dále reprezentováno zelenou L1. Site 2' receptoru je reprezentováno žlutou FNIII-1 doménou. Převzato z [21].

1.4 Analogy insulínu

První chemická syntéza insulínu byla vyvinuta v 60. letech 20. století. První komerční náhrada insulínu byla ale připravena enzymatickou přeměnou vepřového insulínu (jediná odlišnost je v pozici B30). Poté již následovala biosyntetická produkce lidského insulínu pomocí bakterií a později kvasinek [22]. Insulinové analogy, tzn. deriváty insulínu s pozměněnou strukturou, jsou připravovány jednak z důvodu nalezení co nejvhodnějších látek k terapii diabetu (tak aby poskytly pacientům větší komfort) a jednak z důvodu porozumění interakcí mezi insulinem a insulinovým receptorem.

Cílem léčby insulinem je snaha o co největší napodobení jeho fyziologické produkce a působení. Preparáty lidského insulínu ale pro subkutánní podávání nejsou pro své farmakokinetické vlastnosti zcela ideální. Z toho důvodu se neustále hledají další analogy, které by svými vlastnostmi více odpovídaly potřebám organismu. Důležitým faktorem při hledání optimálních analogů je rychlost nástupu biologického účinku po subkutánním podání. Lidský insulin dosahuje maxima své koncentrace v krvi až asi dvě hodiny po vpichu a vydrží působit až 6 hodin. Nyní je k dispozici šest různých insulinových analogů [23]:

- ultrakrátce působící insuliny (nástup účinku za 10-15 minut, maximum působení 30-45 minut, například insuliny LysB28-ProB29 (Humalog), AspB29 (Novorapid/Novalog) či LysB3-GluB29 (Apidra)
- dlouho působící insuliny (nástup účinku za 3-4 hodiny, efekt přetrvává až 36 hodin, například insulin GlyA21-ArgB31-ArgB32 (Lantus), insulin s myristovou kyselinou na LysB29 (Levemir) a des-ThrB30 insulin s γ -glutamyl-hexadekandiovou kyselinou LysB29 (Tresiba).

Pomocí vývinu nových analogů insulínu je také možné sledovat a zkoumat interakce mezi insulinem a IR. Modifikací jednotlivých aminokyselin či spojováním jednotlivých řetězců pomocí chemických můstků a vazeb a zjišťováním vlivu těchto modifikací na afinitu k jednotlivým receptorům je možné získat informace o významu daných aminokyselin pro interakci s IR.

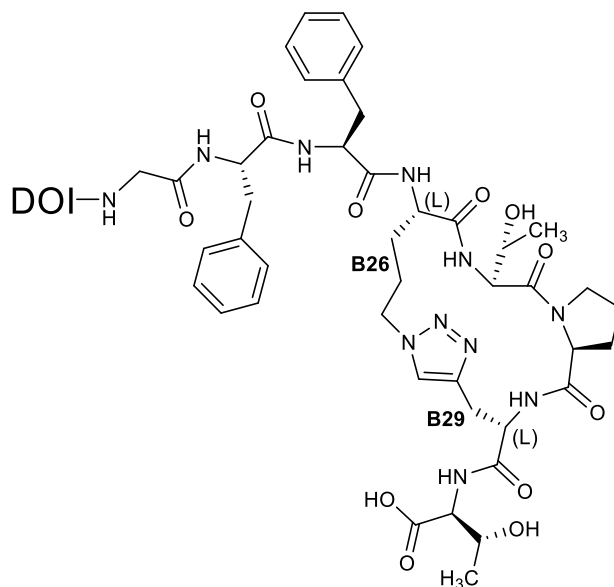
Subkutánní (s.c., tj. podkožní) podávání insulínu je invazivní formou, ač dnešní metody s.c. podání pomocí insulinových per či insulinových pump jsou uživatelsky přívětivější. Přesto se vývoj upírá ve směru inhalovatelné formy insulínu či jeho formy určené k perorálnímu podávání. U perorální formy je ovšem pořád problém v nalezení dobré metody ochrany insulínu před proteolýzou, absorpce skrz střevní bariéru a optimalizaci dávkování vzhledem k přijaté potravě. I inhalovatelné formy jsou rovněž problematické ohledně dávkování [22].

Snaha je také o vyvinutí selektivních insulinových analogů, tedy selektivních vůči IR-A a IR-B. IR-B selektivní analog by byl přínosný vzhledem k tomu, že by mohl lépe napodobit fyziologické působení insulínu a zmírnit nevyrovnané hladiny glykémie u diabetiků po podání exogenního insulínu. Po příjmu glukózy v potravě je v lidském těle insulin nejprve sekretován z pankreatu portální žílou přímo do jater, kde způsobí inhibici enzymů zapojených do glukoneogeneze a glykolýzy, čímž zastaví endogenní produkci cukru v játrech. Až poté insulin vstupuje do periférií, kde zprostředkuje vstup glukózy do svalů a tukové tkáně [13]. V případě s.c. podání naopak insulin působí nejprve na periférii a až pak v játrech, čímž dochází ke zpoždění zastavení produkce glukózy tělem a k nefyziologickým hladinám glykémie u diabetiků. Jelikož játra obsahují v naprosté většině pouze IR-B a periférie jen z části, analog insulínu selektivní pro IR-B by mohl lépe regulovat glykémii u diabetiků [24]. Nedávná studie týmu z Novo Nordisk A/S prokázala, že myšlenka IR-B selektivních analogů je realistická [15]. Tito vědci použili analog insulínu jen relativně mírně selektivní vůči IR-B (asi 3-5x více než lidský insulin) a i tak tento analog byl schopný vyvolávat metabolické efekty insulínu specifické pro IR-B v potkaních. Pokud by bylo možné

vyvinout analog insulin alespoň 10x specifictější pro IR-B než IR-A ve srovnání s lidským insulinem, pak by mohl najít uplatnění při léčbě diabetu.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo navázat na práci Vikové a kol. [25] v níž byl vytvořen a testován analog s modifikací na C-konci B řetězce, kdy byly pozice B26 a B29 spojeny (přemostěny) pomocí tzv. triazolového můstku vytvořeného mezi L-azidopentanovou kyselinou (L-N₃Pent v B26) a L-propargylglycinem (L-Prg v B29) (obrázek 6), který vykazoval vazebnou afinitu asi 220 % k IR-A a především afinitu asi 570 % k IR-B (ve srovnání s lidským insulinem, jehož afinita představuje 100 %) a zjistit, zda změna chiralidy C α uhlíku nepřírodních aminokyselin v polohách B26 či B29 nemůže vést k dalšímu zvýšení selektivity ve prospěch IR-B.



Obrázek 6. Chemická struktura C-konce řetězce B analogu insulinu DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr] vytvořeného ve studii Vikové a kol. [25]. (L) značí chiralitu nepřírodních aminokyselin v polohách B26 a B29 a DOI je des(B23-B30)-insulin.

Cílem práce tedy bylo připravit následující tři analogy insulinu a zjistit jejich vazebné afinity vůči IR-A a IR-B:

DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(D-N₃Pent)-Thr-Pro-(D-Prg)-Thr] (Analog 1)

DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(D-N₃Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr] (Analog 2)

DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(D-Prg)-Thr] (Analog 3)

3 Materiál

Pokud není uvedeno jinak, byly použité chemikálie pořízeny od firem Sigma-Aldrich (Německo), Fluka (Švýcarsko) a Merck (USA).

1,4-butadiol

1,8-diazobicykloundekan (DBU)

1-hydroxybenzotriazol (HOBT)

Acetonitril (ACN)

Buňky IM-9 – ATCC (USA)

Des(B23-B30)-insulin (DOI) – připraven v laboratoři dr. Jiráčka

Diethylether

Dichlormethan (DCM)

Dimethylacetamid (DMA)

Ethylendiaminooctová kyselina (EDTA)

Fmoc aminokyseliny – Iris Biotech GmbH (Německo)

Kyselina askorbová

Kyselina octová (HAc)

Myší embryonální fibroblasty

L-azidopentanová kyselina (L-N₃-Pent) – připraven v laboratoři dr. Jiráčka

L-propargylglycin (L-Prg)

N,N-diisopropylkarbodiimid (DIC)

N,N-dimethylformamid (DMF)

N-methylmorpholin

Octan vápenatý

Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5 H₂O)

Piperidin

Radioaktivní ¹²⁵I-lidský insulin – Perkin-Elmer (USA)

Tericiální butanol (tBut)

Trifluoroctová kyselina (TFA)

Triisopropylsilan (TIS)

Tris/HCl

Trypsin

Wangova pryskyřice substituovaná Fmoc-Thr(OtBu)

4 Metody

4.1 Příprava des(B23-B30)-insulinu (DOI)

Nejprve byl odstraněn zinek z preparátu vepřového insulinu dle Carpentera. 1 g vepřového insulinu byl rozpuštěn v 70 ml 0,25M kyseliny chlorovodíkové. Následně byl insulin vysrážen 1 litrem acetonu vychlazeného na 4°C. Vniklá suspenze se ponechala přes noc v chladu. Poté byla sraženina odstředěna na centrifuze Jouan po 20 minut, při 2000g, opět promyta vychlazeným acetonem a znovu odstředěna. Aceton byl následně odsát a sraženina rozpuštěna v 10% kyselině octové. Roztok byl následně lyofilizován.

Poté bylo použito 500 mg výsledného vepřového insulinu zbaveného zinku, který se následně rozpustil ve 100 ml 0,05M Tris/Hcl pufru o pH 9,0-9,2. V 10 ml 0,1M CaCl₂ bylo rozpuštěno 10 mg trypsinu a tato směs byla převedena k roztoku insulinu. Po 20 hodinách míchání v 4°C byla reakce zastavena úpravou pH na hodnotu 5,4 pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové. Reakční směs byla centrifugována 20 minut při 2000 g. Vzniklý supernatant byl oddělen a peleta byla rozpuštěna v 10% kyselině octové a lyofilizována.

K následné chromatografii byla použita kolona Sephadexu G50 (100 x 7 cm). Jako mobilní fáze se použila 10% kyselina octová. Chromatografie probíhala při laboratorní teplotě. Průtokovou rychlost udržovala peristaltická pumpa Gilson při 1 ml za minutu. Ke sběru frakcí posloužil kolektor Waters a byly sbírány frakce po 15 ml. Následně byla proměřena jejich absorbance na spektrofotometru Perkin-Elmer při 276 nm. Frakce, které obsahovali DOI byly spojeny a lyofilizovány.

4.2 Syntéza oktapeptidů

4.2.1 Syntéza peptidu 1

Syntéza všech tří lineárních peptidů, tj. peptidu	1
(Gly-Phe-Phe-(D-N ₃ Pent)-Thr-Pro-(D-Prg)-Thr),	peptidu 2
(Gly-Phe-Phe-(D-N ₃ Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr) a	peptidu 3

(Gly-(Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(D-Prg)-Thr) probíhala stejným postupem za využití automatického syntetizátoru Spyder Mark II (druhý prototyp Vývojových dílen ÚOCHB).

Peptidy byly připraveny pomocí syntézy na pevné fázi. Jako N α -chránící skupina se použila 9-fluorenylmethyloxykarbonylová skupina (Fmoc). Jako pevná fáze byla

použita Wangova pryskyřice s navázaným Fmoc-Thr(OtBu) v nízké substituci (tzv. LL podle „low-load“, 0,3 mmol/g).

Syntéza peptidů byla provedena v množství 200 μ mol (2 reaktory po 100 μ mol). Každá kondenzace s aminokyselinami za přítomnosti 1-hydroxybenzotriazolu (HOBT, 0,5M, 1 ml) a N,N-diisopropylkarbodiimidu (DIC, 0,5M, 1,2 ml) probíhala 60 minut a poté byla ještě jednou opakována za stejných podmínek.

Deprotekce Fmoc skupiny probíhala po dobu 2x2 minut za pomoci 20% (v/v) piperidinu, 2% (v/v) 1,8-diazobicykloundekanu (DBU) v dimethylformamidu (DMF).

Jak po kondenzační reakci, tak po deprotekcí Fmoc skupiny, byla pryskyřice promyta 5x s 1 ml DMF.

Po syntéze byla pryskyřice s peptidem pečlivě promyta dichlormethanem (DCM) a poté vysušena. Následně byl peptid štěpen s 5 ml 96 % (v/v) kyseliny trifluoroctové (TFA), 2% (v/v) triisopropylsilanu (TIS), 2% (v/v) deionizované vody a štěpení probíhalo 2 hodiny. Následně byla štěpící směs nalita do vychlazeného diethyletheru (5 ml směsi na 45 ml) a vysrážený produkt izolován centrifugací. Sraženina byla propláchnuta diethyletherem a produkt lyofilizován a preparován pomocí RP-HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází) na koloně Luna C18 (Phenomenex) s průtokem 9ml/min a s gradientem, viz tabulka 1. Identita produktu byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie na přístroji LTQ Orbitrap XL metodou ESI v pozitivním módu.

Tabulka 1. Gradient pro preparaci lineárních peptidů 1-3.

Čas [min]	0	30	31
A: 0,1% TFA [%]	75	25	75
B: 0,1% TFA s 80% ACN[%]	25	75	25

4.3 Cyklizace oktapeptidů

Cyklizace lineárních peptidů **1-3** byla provedena pomocí funkčních skupin postranních řetězců aminokyselin v pozicích B26 a B29. Principem této tzv. „klik reakce“ je vytvořit vazbu mezi azidem a alkynelem za pomoci měďných iontů jakožto katalyzátoru. Jedná se o tzv. cykloadici mezi alkyny a azidy katalyzovanou Cu^(I) při které vzniká 1,2,3-triazolová skupina (můstek, Obrázek 6, strana 20) [26; 27].

Cyklizace probíhaly u všech tří lineárních peptidů **1-3** stejně podle následujícího postupu. Bylo odváženo 45 mg čistého lineárního peptidu, což je cca 50 μ mol. Poté

byl ve dvoulitrové baňce připraven roztok o celkovém objemu 2 litry ve složení deionizovaná voda a terciální butanol v poměru 2:1 (v/v). Směs byla důkladně odvzdušněna heliem a následně v ní bylo rozpuštěno 45 mg peptidu. Reakce byla poté odstartována přidáním 14-ti ekvivalentů pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a 14-ti ekvivalentů kyseliny askorbové. Směs byla poté prudce zamíchána a ponechána přibližně 2-14 hodin při pokojové teplotě bez přístupu světla. Průběh reakce byl monitorován pomocí RP-HPLC. Následně byla směs odpařena na rotační vakuové odparce Heidolph do objemu asi 50 ml. Poté byla směs nanesena na dvě kolonky s nosičem C18 (Macherey Nagel) a kolonky byly pečlivě promyty vodou. Následně byl odsolený produkt eluován pomocí 80% acetonitrilu (ACN) ve vodě a poté preparován na semipreparativní koloně Macherey Nagel C18 s průtokem 3ml/min za pomoci gradientu, který je vypsán v následující tabulce 2. Celý postup byl zopakován ještě jednou s 45 mg lineárního peptidu. Purifikovaná množství cyklického peptidu byly spojena. Identita produktu byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tabulka 2. Gradient pro preparaci cyklických peptidů 1-3.

Čas [min]	0	30	31
A: 0,1% TFA [%]	90	0	90
B: 0,1% TFA s 80% ACN[%]	10	100	10

4.4 Enzymová semisyntéza

Cílem enzymatické semisyntézy je spojení des-(B23-B30)-insulinu (DOI, z části 4.1) a cyklických peptidů **1-3** (z části 4.3) v analogy **1-3**. Enzymatická semisyntéza analogu **1** probíhala podle odlišného protokolu nežli semisyntéza analogů **2** a **3**.

4.4.1 Enzymatická semisyntéza analogu 1

Peptid o množství 34 mg, 36,6 mg DOI a 3 mg trypsinu byly rozpuštěny ve 137 μl DMF a 112 μl 0,05M roztoku octanu vápenatého. Směs byla důkladně promíchána a pomocí indikačních papírků bylo změřeno pH, které se následně pomocí 3 μl N-methylmorpholinu upravilo na hodnotu přibližně 6,9 – 7,1.

Následně byla směs míchána a postupně z ní byly odebírány vzorky o objemu 1 μl , které byly analyzovány pomocí HPLC.

Po 5,5 hodinách reakce bylo opět změřeno pH, byl přidán 1 μl N-methylmorpholinu a 1 mg trypsinu a reakce běžela přes noc. Ráno se pH opět přeměřilo, byl přidáno 1 μl N-methylmorpholinu, 1 mg trypsinu a reakce se přemístila do 37°C. Reakce byla

zastavena po 30 hodinách acetonem, sraženina se odstředila na centrifuze, vysušila a následně rozpustila v 10 % kyselině octové.

Preparace probíhala pomocí RP-HPLC s kolonou Macherey Nagel C18 a průtokovou rychlostí 3 ml/min. Na preparaci byl využit gradient, který je uveden v tabulce 3.

4.4.2 Enzymatická semisyntéza analogů 2 a 3

Enzymatická semisyntéza analogu **2** a analogu **3** probíhala podle mírně modifikovaného postupu a metodiky.

Peptid o množství 32 mg, 25 mg DOI a 2,4 mg trypsinu byly rozpuštěny v roztoku o celkovém objemu 677 μ l složeného z 35 % (v/v) dimethylacetamidu (DMA), 35 % (v/v) 1,4-butadiolu a 30 % (v/v) směsi obsahující 0,2M Tris/HCl (pH 8,0), 10mM octan vápenatý a 1mM ethylendiaminooctovou kyselinu (EDTA). Vše bylo důkladně promícháno a pH bylo upraveno pomocí 10-15 μ l N-methylmorpholinu na hodnotu asi 7,0.

Reakční směs byla míchána a postupně byly odebírány vzorky o objemu 1 μ l, které se analyzovaly pomocí RP-HPLC.

Reakce u analogu **2** byla zastavena po 6 hodinách, u analogu **3** po 8 hodinách, přidáním acetonu. Sraženiny byly centrifugovány, vysušeny a následně rozpuštěny v 10 % kyselině octové (HAc).

Následná preparace produktů probíhala obdobně jako u analogu **1** pomocí gradientu uvedeného v tabulce 3.

Tabulka 3. Gradient pro preparaci analogů 1-3.

Čas [min]	0	1	21	34	36	37	37,1
A: 0,1% TFA [%]	90	65	55	45	10	10	90
B: 0,1% TFA s 80% ACN[%]	10	35	45	55	90	90	10

4.5 Vazebné testy

Testování vazebné afinity probíhá kompeticí mezi testovaným analogem a radioaktivně značeným lidským insulinem o receptor insulinu v membránách příslušných buněk.

4.5.1 Příprava roztoků analogů

Cílem přípravy roztoků analogu je připravit roztoky o výsledné koncentraci 100 µg/ml, které budou během vazebných testů nadále ředěny. Roztoky byly připravovány rozpouštěním čistých finálních analogů v 0,1 % kyselině octové. Pro přesné stanovení koncentrace byla měřena absorbance pomocí spektrofotometru Perkin-Elmer při vlnové délce 280 nm. Molární absorpční koeficient (ϵ) je určen podle počtu tyrosinů a cysteinů v molekule podle vztahu $\epsilon_{A280} = (nY \times 1280) + (nC \times 120)$, kde nY je počet tyrosinů a nC počet cysteinů. Hodnota ϵ_{A280} pro lidský insulin (HI) je 5840 M⁻¹cm⁻¹. Pro vytvořené analogy **1-3** jsou hodnoty molárního absorpčního koeficientu totožné a to 4560 M⁻¹cm⁻¹ (oproti HI obsahují jen 3 tyrosiny).

4.5.2 Příprava buněk IR-A

Pro testování afinity ligandů k IR-A byly použity lidské buňky IM-9 exprimující výhradně receptor IR-A a ne receptor IR-B. Buňky byly kultivovány při 37°C za přítomnosti 5% CO₂, v RPMI 1640 médiu obsahující 10% fetální hovězí sérum (FBS), 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 2 ml mM L-glutaminu. Poté byly buňky naředěny tak, aby jejich koncentrace v suspenzi byla 2 miliony na 1 ml.

4.5.3 Testování s receptorem IR-A

Buňky byly umístěny do polystyrenové krabice do 15°C lázně (směs voda a led, hlídáno teploměrem).

Poté byl HBB pufr (viz níže) naředěn radioaktivní ¹²⁵I-lidský insulin (2200 Ci/mmol) na výslednou hodnotu 20 000 cpm/50 µl.

Následně byl HBB pufr naředěn roztok analogu ze zásobní koncentrace 10⁻⁵ na koncentrace 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ a 10⁻¹¹. Vazebný HBB pufr obsahuje 100mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM KCl, 1,3mM síran hořečnatý, 1mM EDTA, 10mM glukosu, 15mM octan sodný a 1 % (w/v) sérový hovězí albumin (BSA), pH je upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,6.

Následně byly do připravených zkumavek v různých objemech pipetovány následující komponenty v tomto pořadí: vazebný pufr, analog o příslušné finální koncentraci, radioaktivní insulin (finální koncentrace 0,01 nM) a na závěr buňky (800000 buněk). Celkový objem směsi činil 500 µl. Zkumavky byly inkubovány při 15°C po dobu 2,5 hodiny a co 30 minut byly promíchávány.

Po inkubaci byly z každé reakční směsi vytvořeny duplikáty pipetováním 200 μ l roztoku do centrifugačních zkumavek obsahujících 200 μ l ledově studeného HBB pufru čímž byla reakce zastavena. Duplikáty byly následně stočeny v centrifuze Jouan při 13000 rpm po 10 min při 4°C. Následně byl supernatant odsát a radioaktivita v peletách měřena na přístroji Wizard 1470 Automatic γ Counter. Doba měření jednoho vzorku byla 60 sekund.

Vazebná data byla analyzována v programu GraphPad Prism 5 za použití metody nelineární regrese a modelu vazby do jednoho místa, který bere v úvahu možnou depleci ligandu. Jednotlivé vazebné křivky byly vytvořeny z duplicitních hodnot (viz výše) a z nich vypočteny příslušné disociační konstanty analogu. Výsledná disociační konstanta (K_d) byla vypočtena z minimálně tří dílčích vazebných křivek. Pro výpočet byla použita disociační konstanty 125 I-insulinu o hodnotě 0,3 nM.

4.5.4 Příprava buněk IR-B

Pro testování afinity k receptoru IR-B bylo využito myších embryonálních fibroblastů s deletovaným receptorem pro IGF-1 a transfekovaných lidským IR-B receptorem.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C ve zvlhčené atmosféře s 5% (v/v) obsahem oxidu uhličitého v DMEM mediu s obsahem glukosy 4,5 g/l, 10% (w/w) FBS, 2mM L-glutaminem, 100 U/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 3 μ g/ml puromycinu a byly třikrát týdně pasážovány. 24 hodin před testováním byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček v množství asi 12000 buněk na jamku. Čtyři až šest hodin před testováním bylo médium vyměněno za médium bez FBS. Konečný počet buněk pro testování se pohyboval okolo 30000 buněk na jamku.

4.5.5 Testování IR-B

Nejprve byl HBB pufrem naředěn radioaktivní 125 I-lidský insulin (2200 Ci/mmol) na výslednou hodnotu 50 000 cpm/50 μ l. Následně byl HBB pufrem naředěn roztok analogu ze zásobní koncentrace 10^{-5} na 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} a 10^{-11} . Narostlé buňky v 24-jamkové destičce byly dvakrát promyty vazebným pufrem (jeho složení je popsáno v kapitole 4.5.3). Následně byla do každé jamky pipetována reakční směs v pořadí: vazebný pufr, analog o příslušné koncentraci a radioaktivita (výsledná koncentrace traceru činila 0,039 nM). Celkový objem reakční směsi byl 250 μ l. Každé koncentrace (zkumavka) byla vytvořena v duplikátu.

Reakce se inkubovala za kontinuálního míchání na třepačce v 5°C po dobu 16 hodin. Po ukončení této doby byla reakční směs odsáta, jednotlivé vzorky byly dvakrát promyty 300 μ l vazebného pufru a poté solubilizovány v 300 μ l NaOH (hydroxidu

sodného), čímž došlo k ukončení reakce. Po 15 minutách byly solubilizované buňky i s roztokem přeneseny do popsaných zkumavek a následně se změřila jejich radioaktivita na přístroji Wizard 1470 Automatic γ Counter. Doba měření jednoho vzorku byla 60 sekund.

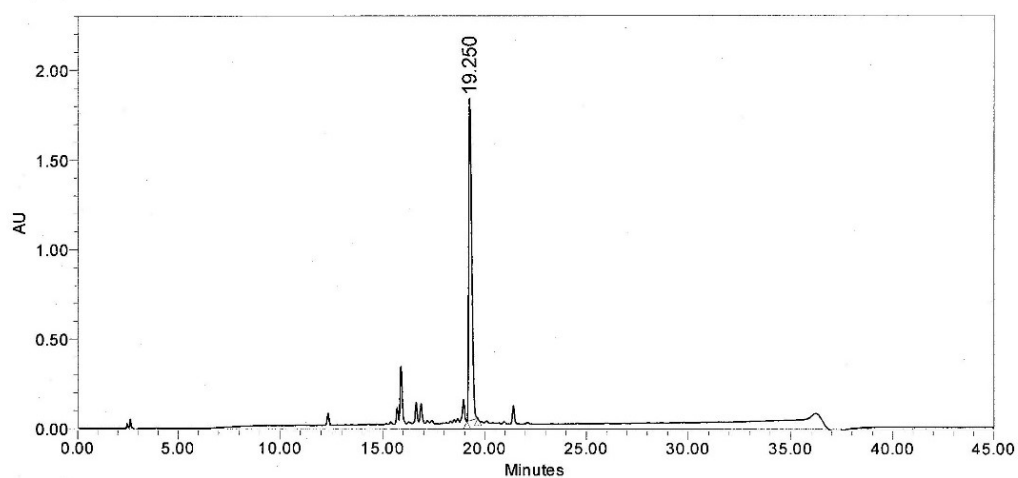
Vazebné křivky byly analyzovány stejným způsobem, jako je popsáno pro receptor IR-A.

5 Výsledky

5.1 Syntéza oktapeptidů

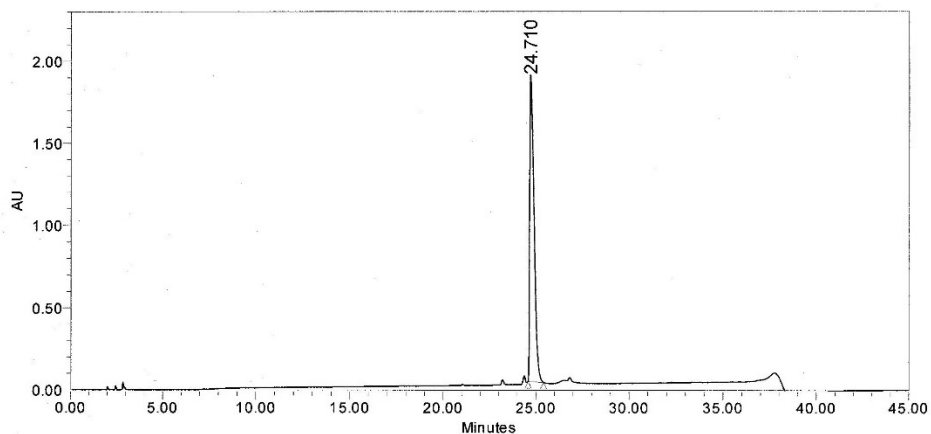
Pomocí syntézy na pevné fázi byly připraveny 3 oktapeptidy (peptid **1**, peptid **2** a peptid **3**), které byly dále použity pro přípravu analogů. Surové peptidy byly purifikovány pomocí RP-HPLC za podmínek uvedených v kapitole 4.2 a následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Analytický chromatogram surového peptidu **1** se nachází na obrázku 7. Odebírán byl pík, který se nachází na 19,250 minutě.

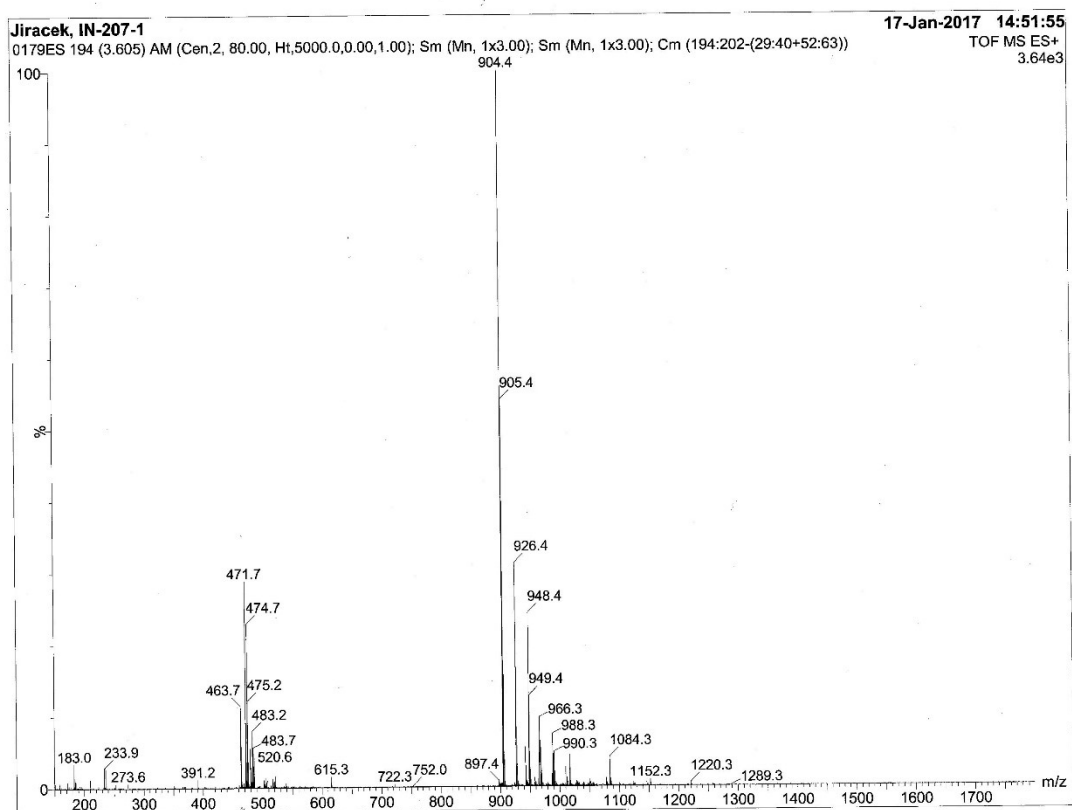


*Obrázek 7. RP-HPLC chromatogram připraveného surového lineárního peptidu **1**. Peptid je eluován v čase 19,250 min. Měřeno při vlnové délce 218 nm.*

Chromatogram purifikovaného peptidu pomocí PR-HPLC je znázorněn na následujícím obrázku 8. Použitý gradient je v příslušné kapitole 4.2. Na obrázku 9 je hmotnostní spektrum produktu, které potvrzuje jeho identitu.



Obrázek 8. PR-HPLC chromatogram purifikovaného peptidu **1**. Peptid se nachází na 24,710 minutě. Měřeno při vlnové délce 218 nm.



Obrázek 9. Hmotnostní spektrum purifikovaného peptidu **1** měřené metodou ESI v pozitivním módu. Teoretická hmotnost molekulová hmotnost (M_r) je 904,4. Signálu m/z 904,4 tedy odpovídá MH^+ , tedy molekule s jedním atomem vodíku. Další výrazný signál m/z 926,4 odpovídá peptidu **1** s jedním atomem sodíku a signál 471,7 odpovídá peptidu **1** s jedním atomem draslíku.

Chromatogramy a hmotnostní spektra peptidu **2** a peptidu **3** jsou obdobné. Při syntéze se vycházelo z 200 μmol množství, finální výtěžky čistých peptidů jsou uvedeny v následující tabulce 4. Nejvyšší výtěžek vykazoval peptid **1** a to 50,1 %, peptid **2** vykazoval výtěžek 48,2 % a peptid **3** 41,8%.

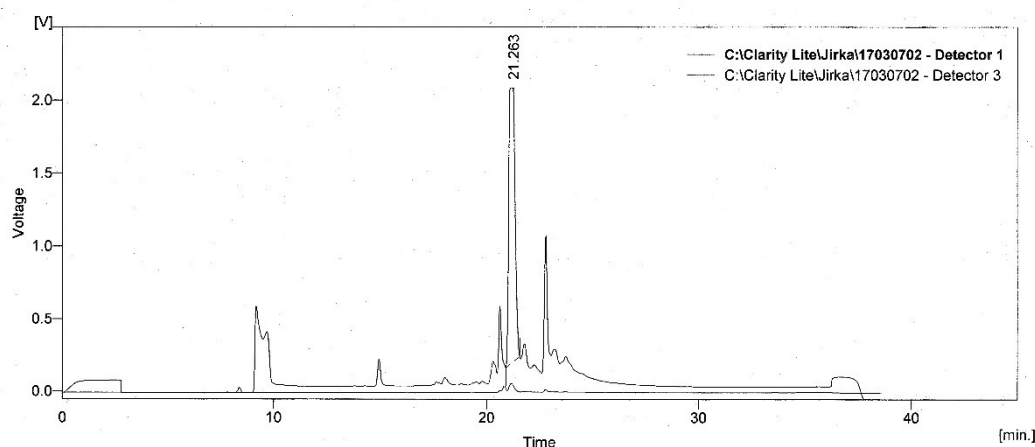
Tabulka 4. Výtěžek a relativní molekulové hmotnosti lineárních peptidů. M_r teoretická označuje vypočítanou molekulovou hmotnost, M_r experimentální označuje experimentálně zjištěnou molekulovou hmotnost.

Peptid	M_r teoretická	M_r experimentální (MH+)	Výtěžek
Peptid 1	903,42	904,4	50,1 %
Peptid 2	903,42	904,4	48,2 %
Peptid 3	903,42	904,4	41,8 %

5.2 Cyklizace oktapeptidů

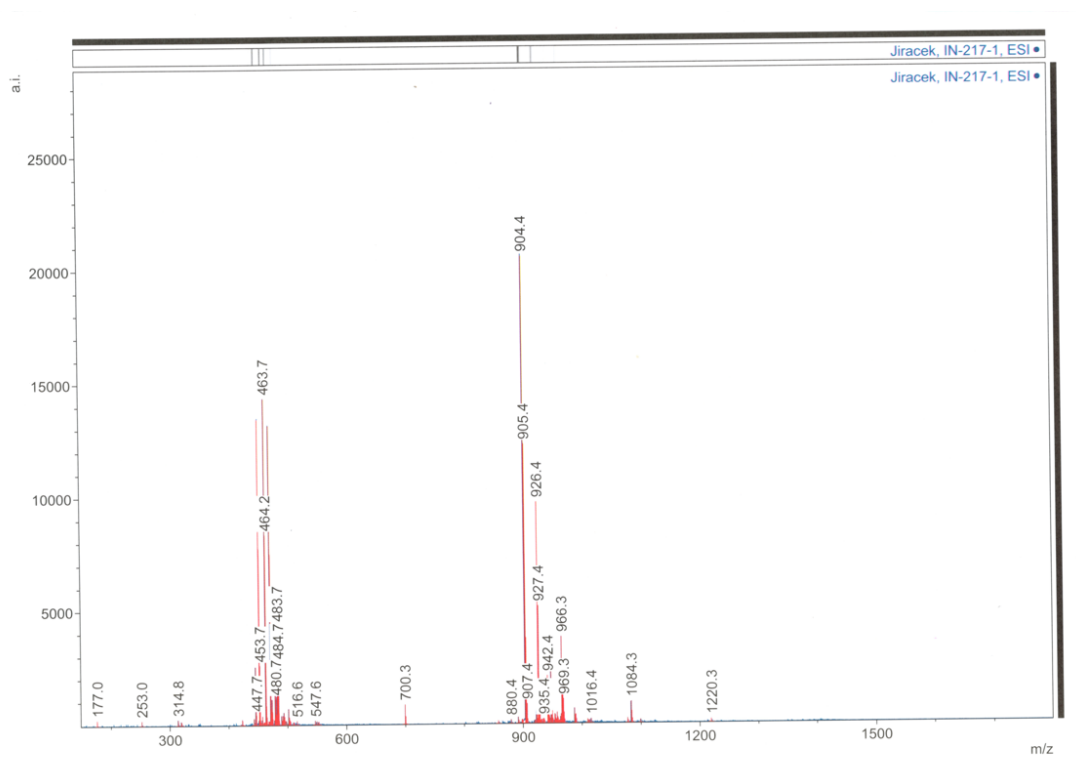
Cyklizace oktapeptidů probíhala pomocí takzvané „klik reakce“, došlo tedy k vytvoření vazby (1,2,3-triazolu) mezi azidem a alkynem za pomoci měďných iontů. Surové cyklické peptidy byly následně purifikovány pomocí RP-HPLC (podmínky purifikace jsou uvedeny v kapitole 4.3) a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Vznik cyklického produktu byl průběžně monitorován analyticky pomocí RP-HPLC, kde docházelo k posunu hlavního píku směrem doleva (byl eluován dříve). Na následujícím obrázku 10 je znázorněn surový cyklický peptid **1** po odpaření a odstranění mědi. Odebírán byl pík, který byl eluován v 21,263 minutě.



*Obrázek 10. RP-HPLC chromatogram připraveného surového cyklického oktapeptidu **1**. Peptid je eluován v čase 21,263 min. Chromatogram byl monitorován při 218 nm a 276 nm.*

Identita purifikovaného cyklického peptidu **1** byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie, jak je patrné na obrázku 11.



Obrázek 11. Hmotnostní spektrum purifikovaného peptidu **1** měřené metodou ESI v pozitivním módu. Signálu m/z 904,4 tedy odpovídá MH^+ , tedy molekule cyklického peptidu **1** s jedním atomem vodíku. Signál 463,7 odpovídá 2x nabitě molekule peptidu **1** s jedním atomem sodíku.

Chromatogramy a výsledky hmotnostní spektroskopie cyklických peptidů **2** a **3** byly obdobné jako u výše rozebraného cyklického peptidu **1**. Výchozí množství lineárního peptidu použitého na cyklizaci činilo vždy 100 μmol a finální výtěžky cyklických peptidů jsou znázorněny v tabulce 5 společně s jejich relativní molekulovou teoretickou a experimentálně zjištěnou relativní molekulární hmotností. U cyklického peptidu **1** byl výtěžek 26,0 %, u peptidu **2** 97,3 % a u peptidu **3** 61,2 %.

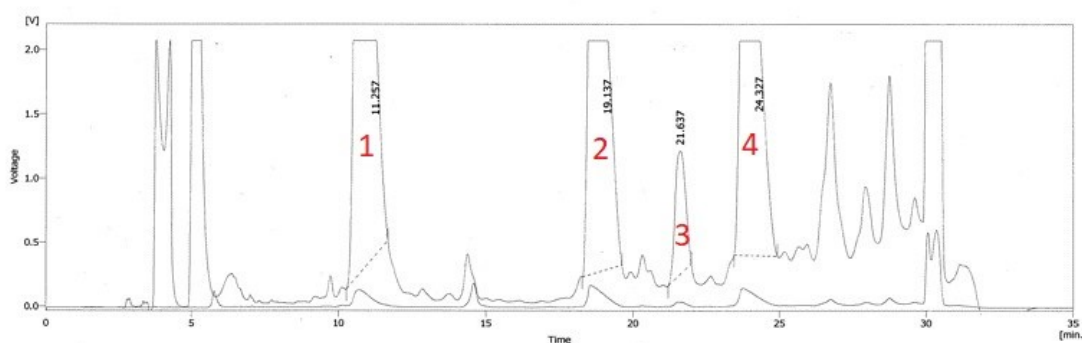
Tabulka 5. Výtěžek a relativní molekulové hmotnosti cyklických peptidů.

Peptid	M_r teoretická	M_r experimentální (MH^+)	Výtěžek
Cyklický peptid 1	903,4	904,4	26,0 %
Cyklický peptid 2	903,4	904,4	97,3 %
Cyklický peptid 3	903,4	904,4	61,2 %

5.3 Enzymová semisyntéza

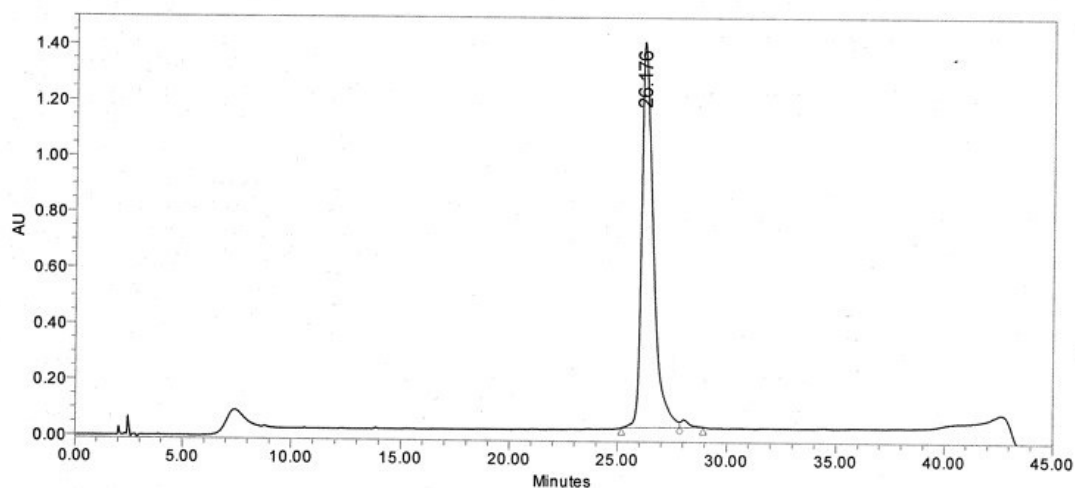
Cyklické peptidy **1**, **2** a **3** byly využity pro enzymovou semisyntézu popsanou v kapitole 4.4. Její průběh byl průběžně sledován pomocí RP-HPLC. Identifikace analogů poté byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie.

Po ukončení semisyntézy byla směs purifikována pomocí semipreparativní PR-HPLC. Chromatogram purifikace analogu **1** po enzymové reakci je uveden na obrázku 12. Jednotlivé píky, které byly postupně odebírány a následně analyzovány, jsou z důvodu přehlednosti očíslovány. Produkt se nacházel ve frakci číslo 4, která byla eluována v 24,327 minutě.

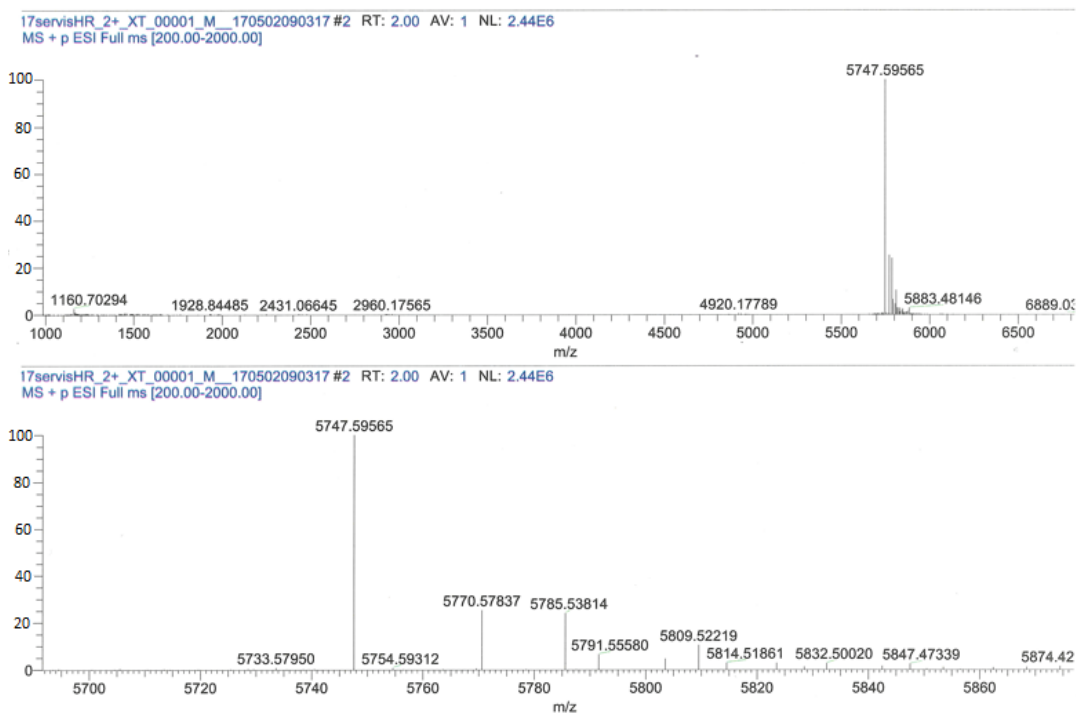


Obrázek 12. RP-HPLC chromatogram připraveného surového analogu **1**. Analog je eluován v čase 24,327 min (pík 4). Pík 1 je výchozí cyklický oktapeptid, pík 2 je DOI a u píku 3 nebyla identita potvrzena. Chromatogram byl monitorován při 218 nm a 276 nm.

Analytický chromatogram výsledného purifikovaného analogu **1** z PR-HPLC je znázorněn na obrázku 13. Jeho identita byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie (obrázek 14).

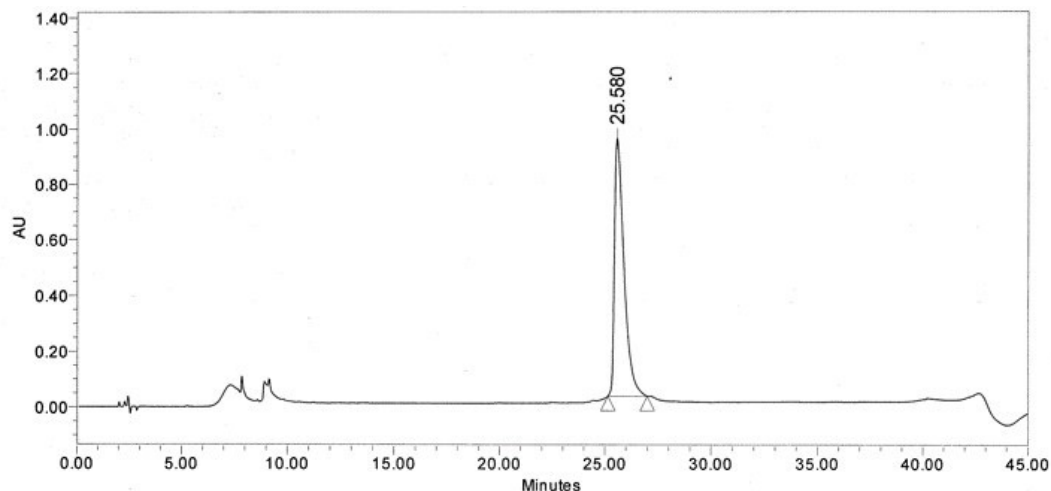


Obrázek 13. RP-HPLC chromatogram připraveného čistého analogu 1. Analog byl eluován v 26,176 minutě. Měřeno při vlnové délce 218 nm.

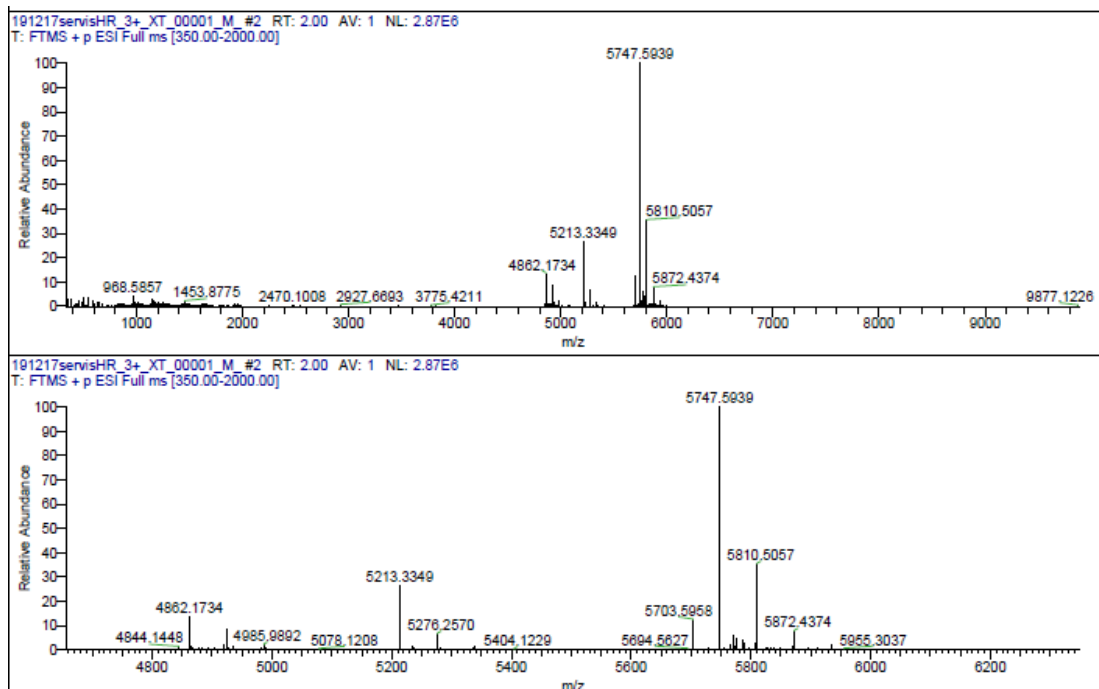


Obrázek 14. Hmotnostní spektrum purifikovaného analogu 1 měřené metodou ESI v pozitivním módu. Teoretická relativní molekulová hmotnost je 5747,5862, což odpovídá signálu m/z 5747,5956 (vysoké rozlišení, byla provedena dekonvoluce spektra, tzn. odečtení vodíkového atomu).

Chromatogramy purifikace analogů **2** a **3** vypadají obdobně jako u analogu **1**. Chromatogram z PR-HPLC výsledného purifikovaného analogu **2** je znázorněn na obrázku 15 a jeho potvrzení identity pomocí hmotnostní spektrometrie na obrázku 16.

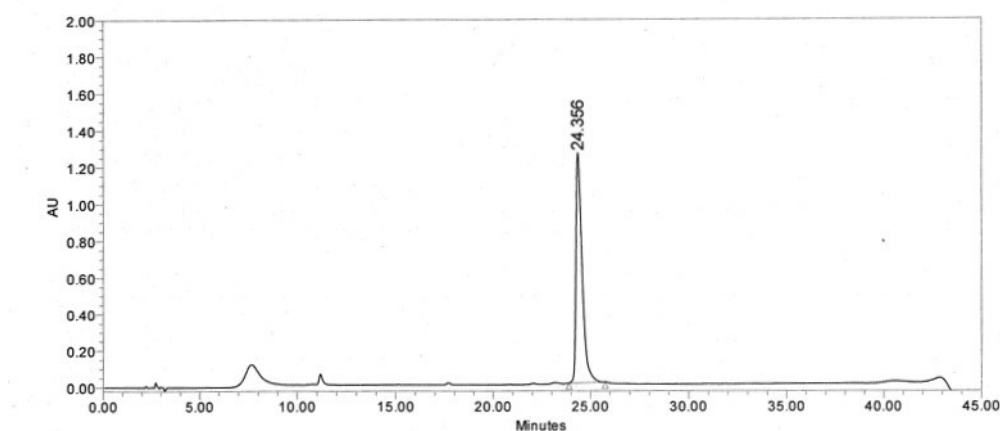


Obrázek 15. RP-HPLC chromatogram připraveného čistého analogu **2**. Analog byl eluován v 25,580 minutě. Měřeno při vlnové délce 218 nm.

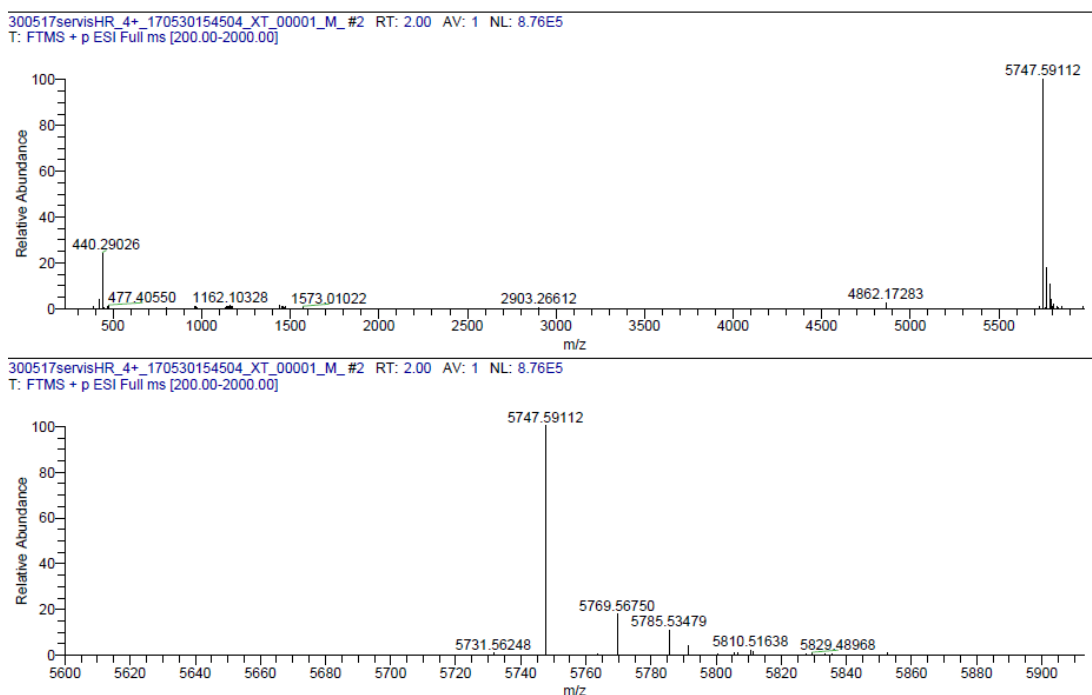


Obrázek 16. Hmotnostní spektrum purifikovaného analogu **2** měřené metodou ESI v pozitivním módu. Teoretická relativní molekulová hmotnost je 5747,5862, což odpovídá signálu m/z 5747,5939 (vysoké rozlišení, byla provedena dekonvoluce spektra, tzn. odečtení vodíkového atomu).

Chromatogram výsledného purifikovaného analogu **3** z RP-HPLC je patrný na obrázku 17. Potvrzení identity pomocí hmotnostní spektrometrie na obrázku 18.



Obrázek 17. RP-HPLC chromatogram připraveného čistého analogu **3**. Analog byl eluován v 24,356 minutě. Měřeno při vlnové délce 218 nm.



Obrázek 18. Hmotnostní spektrum purifikovaného analogu **3** měřené metodou ESI v pozitivním módu. Teoretická relativní molekulová hmotnost je 5747,5862, což odpovídá signálu m/z 5747,59112 (vysoké rozlišení, byla provedena dekonvoluce spektra, tzn. odečtení vodíkového atomu).

Finální výtěžky jsou shrnuty v následující tabulce 6. Celkově bylo získáno 4,6 mg analogu **1**, což odpovídá výtěžku 10,6 % (vůči DOI, který představoval během

enzymatické semisyntézy limitující složku). Analog **2** měl výtěžek nejvyšší a to 17,4 %, bylo ho získáno 5,2 mg, a analog **3** dosáhl hodnot 4,1 mg a výtěžek 13,7 %.

Tabulka 6 Výtěžek a relativní monoisotopické molekulové hmotnosti finálních analogů ve vysokém rozlišení a po dekonvoluci spektra, tzn. po odečtení vodíkového atomu.

Analog	M _r teoretická	M _r experimentální	Výtěžek
Analog 1	5747,5862	5747,5957	10,6 %
Analog 2	5747,5862	5747,5939	17,4 %
Analog 3	5747,5862	5747,5911	13,7 %

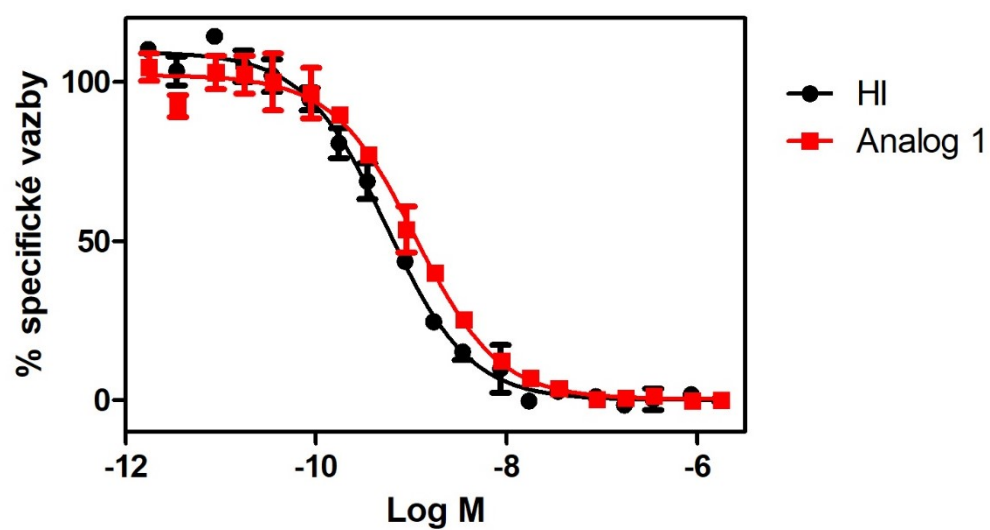
5.4 Vazebné testy

Cílem vazebných testů je určení vazebné disociační konstanty (K_d) všech tří vytvořených analogů vůči oběma isoformám receptoru insulinu, tedy IR-A a IR-B.

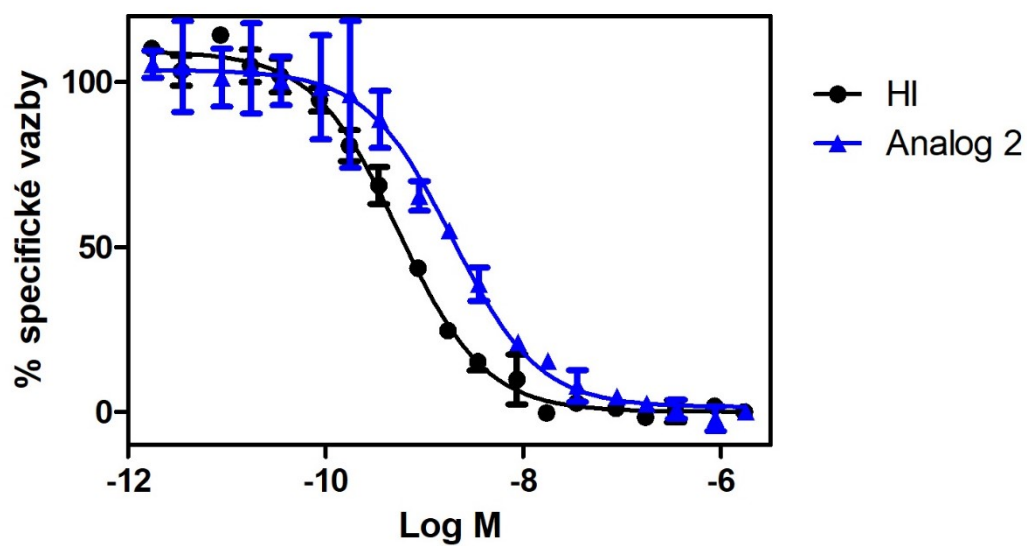
V kapitole 4.5 je popsán postup testování včetně způsobu vyhodnocení. Všechny vazebné křivky byly provedeny v duplikátech a každá křivka byla změřena třikrát. Následně byla z disociačních konstant jednotlivých křivek vypočtena celková disociační konstanta a také relativní vazebná afinita, která je počítána vůči 100 % vazebné afinitě lidského insulinu. Hodnoty celkových K_d a relativních vazebných afinit všech připravených analogů včetně lidského insulinu vůči oběma isoformám IR jsou shrnuty v následující tabulce 7. Reprezentativní vazebné křivky jednotlivých analogů a lidského insulinu k IR-A jsou potom znázorněny na obrázcích 19-21, k IR-B na obrázcích 22-24.

*Tabulka 7. Hodnoty disociačních konstant (průměr naměřených hodnot a jejich směrodatná odchylka) lidského insulinu a analogů **1**, **2** a **3** vůči IR-A a IR-B a jejich relativní vazebná afinita v procentech vztažená k vazebné afinitě lidského insulinu (100%). Relativní vazebná afinita je spočítána jako K_d lidského insulinu/ K_d analogu x 100.*

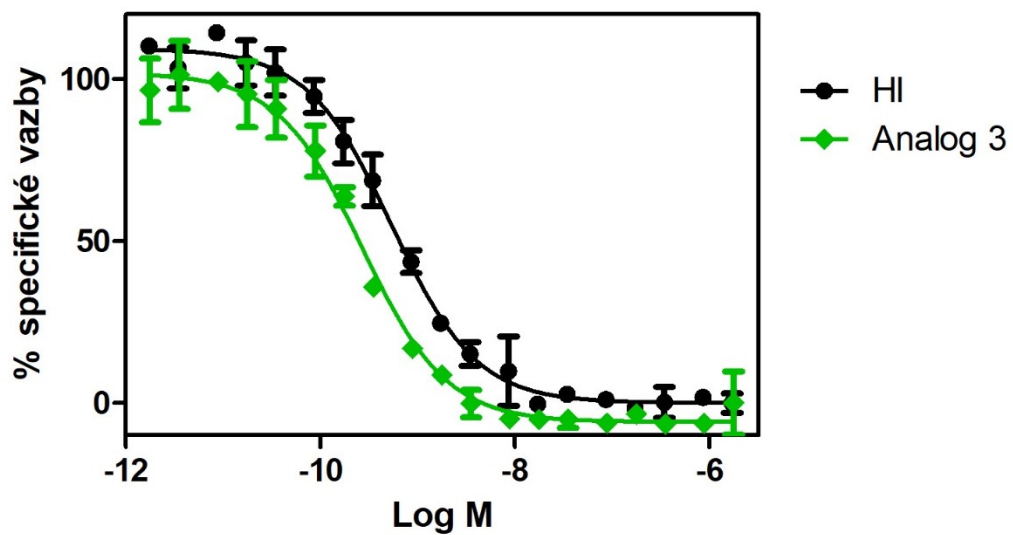
Analog	K_d [nM] vůči IR-A (n=3)	Relativní vazebná afinita vůči IR-A [%]	K_d [nM] vůči IR-B (n=3)	Relativní vazebná afinita vůči IR-B [%]
Lidský insulin	0,51 ± 0,03	100	0,48 ± 0,08	100
Analog 1	1,07 ± 0,03	47,7	1,13 ± 0,13	42,5
Analog 2	1,81 ± 0,04	28,2	1,59 ± 0,33	30,2
Analog 3	0,25 ± 0,09	204	0,12 ± 0,04	400



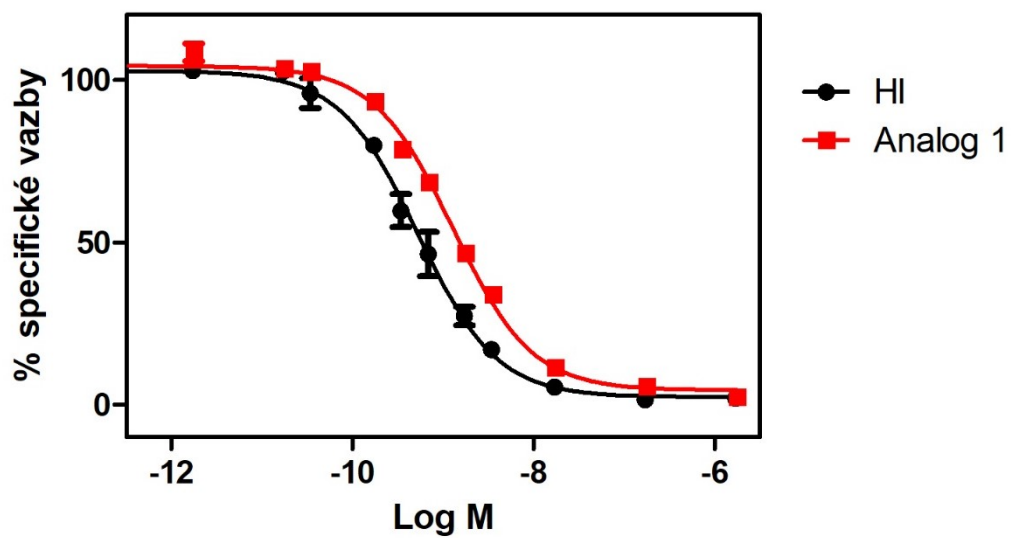
Obrázek 19. Inhibice vazby ^{125}I -lidského insulínu na IR-A lidským insulínem (černě) a analogem 1 (červeně) v závislosti na jejich molární koncentraci.



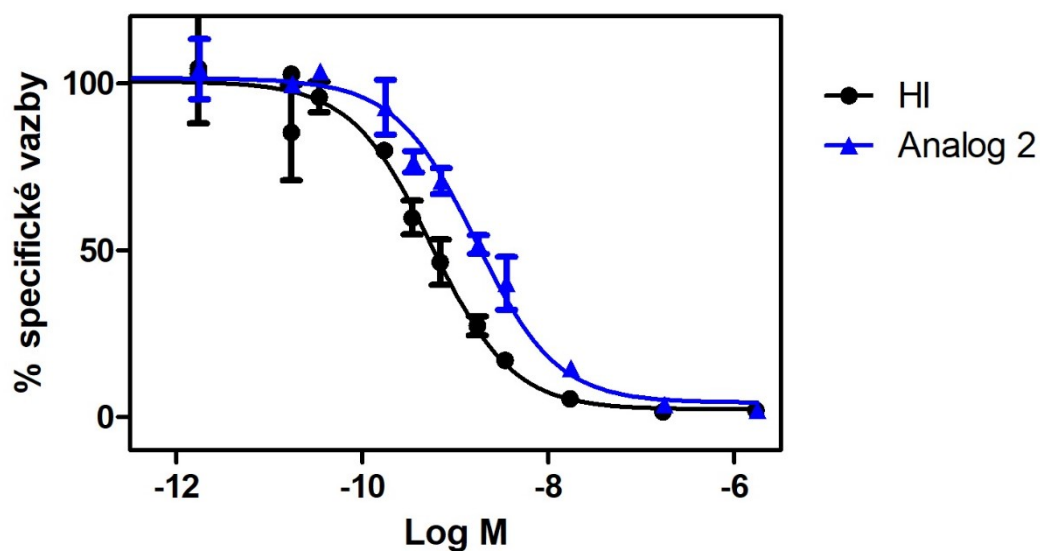
Obrázek 20. Inhibice vazby ^{125}I -lidského insulínu na IR-A lidským insulínem (černě) a analogem 2 (modře) v závislosti na jejich molární koncentraci.



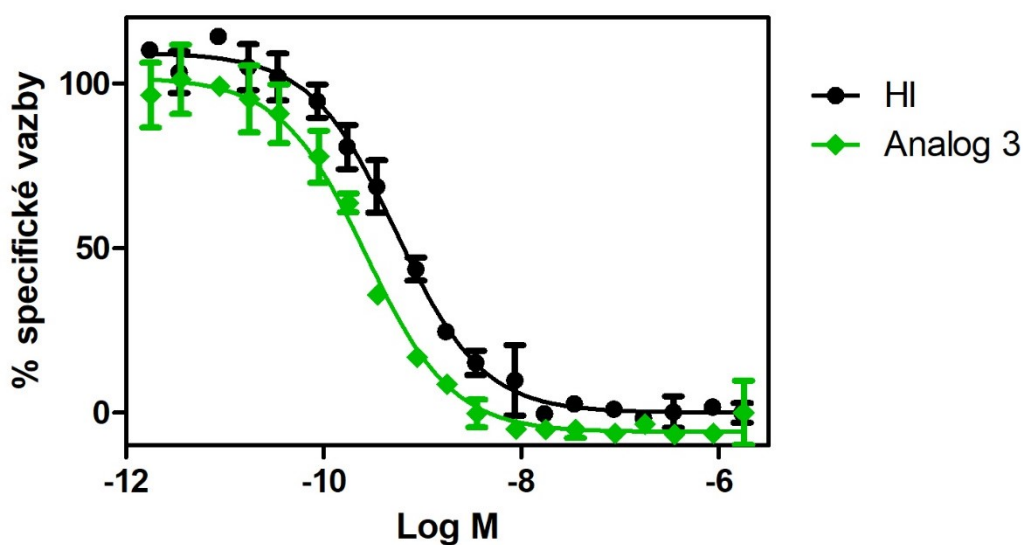
Obrázek 21. Inhibice vazby ^{125}I -lidského insulinu na IR-A lidským insulinem (černě) a analogem 3 (zeleně) v závislosti na jejich molární koncentraci.



Obrázek 22. Inhibice vazby ^{125}I -lidského insulinu na IR-B lidským insulinem (černě) a analogem 1 (červeně) v závislosti na jejich molární koncentraci.



Obrázek 23. Inhibice vazby ^{125}I -lidského insulinu na IR-B lidským insulinem (černě) a analogem 2 (modře) v závislosti na jejich molární koncentraci.



Obrázek 24. Inhibice vazby ^{125}I -lidského insulinu na IR-B lidským insulinem (černě) a analogem 3 (zeleně) v závislosti na jejich molární koncentraci.

Vazebná afinita analogů 1 a 2 byla ve srovnání s lidským insulinem vůči oběma isoformám IR snížena přibližně stejnou měrou a to znamená, že nevykazují selektivitu ani k jednomu typu IR. U analogu 1 byla afinita k IR-A asi 47 % a k IR-B 42 %. Analog 2 vykazoval afinitu k IR-A 28 % a k IR-B 30 %. Analog 3 měl afinitu s IR-A i k IR-B ve srovnání s lidským insulinem poměrně výrazně zvýšenou, k IR-A na 204 %, k IR-B dokonce asi 400 %. Vyznačoval tedy asi dvojnásobnou selektivitu vůči IR-B.

6 Diskuze

Obsahem této bakalářské práce byla příprava tří nových analogů insulínu s modifikací na C-konci B řetězce pomocí triazolového můstku v pozicích B26 a B29 a zjištění jejich relativní vazebné afinity vůči IR-A a IR-B *in vitro*. Analogy se lišily chiralitou C α atomů nepřirozených aminokyselin v polohách B26 a B29 a cílem bylo porovnání jejich vazebných afinit vůči receptorům IR-A a IR-B vzhledem k již dříve připravenému podobnému analogu s konfigurací L a L v těchto polohách (obrázek 6, str. 21) [25]. Všechny 4 analogy tedy tvoří jednotlivé diastereoizomery té samé látky.

Syntéza lineárních peptidů pomocí automatického syntetizátoru Spyder Mark II na pevné fázi proběhla úspěšně. Výtěžek po RP-HPLC purifikaci peptidu **1** byl 50,1 %, peptidu **2** 48,2 % a peptidu **3** 41,8 %. Tyto výtěžky byly uspokojivé a odpovídají standardům dosaženým v minulosti s podobnými peptidy [25].

Cyklizace vzniklých peptidů byla provedena pomocí cykloadiční reakce katalyzované měďnými ionty mezi postranními řetězci kyseliny azidopentanové v pozici B26 a propargylglycinu v pozici B29. Nejprve bylo nutné optimalizovat podmínky, aby cyklizace proběhla správným způsobem a nevznikal dimer. Téměř optimálních podmínek se podařilo dosáhnout snížením koncentrace roztoku lineárního peptidu na 25 $\mu\text{mol/l}$ a omezením míchání reakční směsi na nutné minimum. Po této optimalizaci vznikl námi požadovaný produkt téměř okamžitě. Jelikož má lineární i cyklická forma peptidů totožnou relativní molekulovou hmotnost (tabulka 4 a 5), bylo nezbytné probíhající reakci sledovat pomocí RP-HPLC, kde došlo k posunu retenčního času produktu oproti výchozí látce. Výtěžek purifikovaných cyklických peptidů byl pro cyklický peptid **1** 26,0 %, pro cyklický peptid **2** 97,3 % a pro cyklický peptid **3** 61,2 %. Nižší výtěžek peptidu **1** ve srovnání s peptidy **2** a **3** byl pravděpodobně i přes nízkou koncentraci cyklizační reakce způsoben vznikem oligomerů peptidu (dimery, trimery, tetramery atd.), které jsou mnohem méně polární než monomer a zůstávají ireverzibilně navázány na nosič C18 (nejsou eluovány acetonitrilem), který slouží pro odsolení cyklizační reakce. Z tohoto důvodu je použití takového nosiče velmi důležité, protože by jinak došlo k znehodnocení chromatografických kolon používaných pro purifikaci peptidu. Zvýšená oligomerizace peptidu **1** je pravděpodobně zapříčiněna specifickou konformací peptidu s konfigurací D, D v polohách B26 a B29, která nesměřuje příslušnou azido skupinu a alkynovou skupinu do vzájemné blízkosti, která by usnadnila jejich cyklizaci v monomeru, ale naopak favorizuje formu cyklizace mezi dvěma a více různými molekulami peptidu. Je zajímavé, že v předchozí studii [25] byly cyklizace prováděny při vyšší 50 μM a k

dimerizacím příliš nedocházelo. Analogy insulinu byly ale vesměs cyklizovány v jiných polohách (B24 a B29, B25 a B29, B27 a B29).

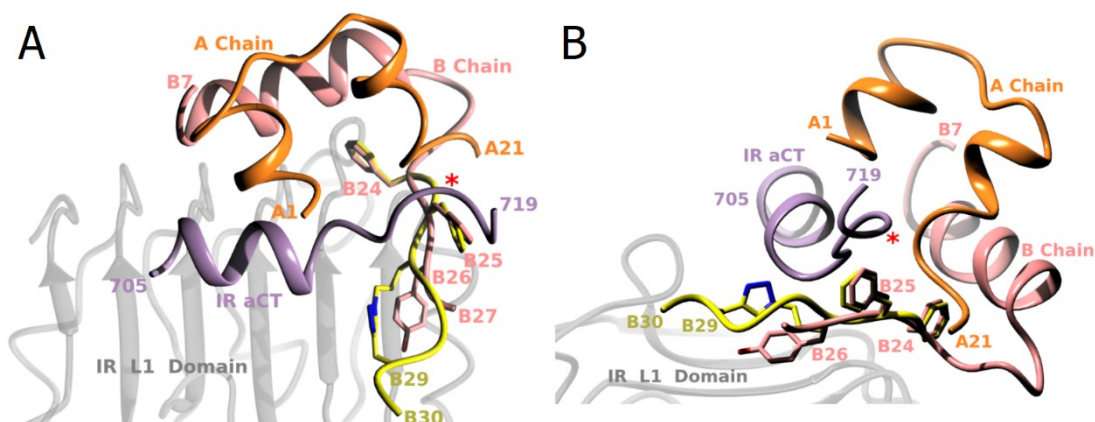
Následně byly syntetizované cyklické peptidy využity pro enzymovou semisyntézu. Výtěžek semisyntézy (vzhledem k DOI, který představoval limitující složku reakce) byl u purifikovaného analogu **1** 10,6 %, u analogu **2** 17,4 % a u analogu **3** 13,7 %. Tyto výtěžky jsou v souladu s výtěžky podobných analogů připravených dříve v laboratoři (10-15%). Nižší výtěžek v případě peptidu **1** byl zřejmě způsoben nízkou rozpustností cyklického peptidu **1** v reakční směsi (4.4.1). Pro peptidy **2** a **3** se použila jiná varianta semisyntetické reakce (4.4.2) při nižší koncentraci a tudíž i lepší rozpustností. Jak se ukázalo během optimalizace podmínek, pro vznik finálních analogů během semisyntézy byla nezbytná i úprava pH na hodnotu přibližně 7 (měřeno pomocí indikačních papírků) relativně velkým množstvím N-methylmorpholinu. U enzymatické semisyntézy analogu **1** bylo použito 5 µl, u enzymatické semisyntézy analogů **2** a **3** bylo potřebné množství N-methylmorpholinu dokonce 10-15 µl. Je to asi způsobeno tím, že peptidy purifikované pomocí RP-HPLC s sebou i po lyofilizaci „přinášejí“ vázanou kyselinu TFA, kterou je třeba neutralizovat.

Semisyntézami bylo získáno dostatečné množství finálních analogů (analogu **1** 4,6 mg, analogu **2** 5,2 mg, analogu **3** 4,1 mg). Každý z analogů byl tedy otestován pomocí 3 vazebných křivek (každá z nich ještě v duplikátech) vůči oběma isoformám insulinového receptoru.

Analog **1** (DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(D-N₃Pent)-Thr-Pro-(D-Prg)-Thr]) a analog **2** (DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(D-N₃Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr]) vykazovaly slabší relativní vazebnou afinitu než lidský insulin a nebyly selektivní ani k jednomu typu IR. Analog **1** dosahoval k IR-A 47,7 % afinity (v porovnání se 100 % lidského insulinu) a k IR-B 42,5 %, u analogu **2** tyto hodnoty byly 28,2 % k IR-A a 30,2 % k IR-B. Analog **3** (DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(D-Prg)-Thr]) vykazoval zvýšenou selektivitu k IR-B receptoru (400 %) oproti IR-A (204 %) a celkově se jeho vazba na IR tedy ukázala silnější než u lidského insulinu.

Cílem této práce bylo navázat na studii Viková a kol. [25], během níž byl připraven analog s triazolovým můstek ve stejných pozicích, nicméně v rozdílné Cα konfiguraci a to L, L v polohách B26 a B29. Tento „referenční“ analog DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr] vykazoval relativní vazebnou afinitu vůči IR-A 220 % a k IR-B 570 % a byl tedy ještě více selektivní ve prospěch IR-B nežli námi vytvořený analog **3**. Na obrázku 25 je pro ilustraci zobrazen komplex receptoru insulinu s tímto „referenčním“ analogem v konfiguraci L, L, tak jak byl

publikován ve Viková a kol. [25]. Důvod relativně vyšší specifity analogu vůči IR-B (2,6x více než vůči IR-A) není z obrázku zřejmý, neboť chybí strukturní informace o poloze 12 „extra“ aminokyselin IR-B jejichž umístění je na obrázku označeno hvězdičkou.



Obrázek 25. Dva různé pohledy na komplex receptoru insulinu s „referenčním“ analogem DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr]. Doména L1 receptoru insulinu je znázorněna šedě a helikální α CT peptid fialově. Tento α CT peptid představuje „krátkou“ variantu z IR-A. Místo vložení 12 aminokyselin IR-B je označeno hvězdičkou. C-konec řetězce B analogu (aminokyseliny B24-B30) je vyznačen žlutě a dusíkové atomy triazolového můstku jsou modré. Analog je přeložen se strukturou navázaného lidského insulinu, ve které je řetězec B růžový (končí C α atomem B27) a řetězec A oranžový. Až na C konec řetězce B byly struktury analogu i lidského insulinu stejné, proto je z analogu ukázán jen C konec řetězce B. Pro názornost jsou ukázány i postranní řetězce aminokyselin v polohách B24, B26 a B26. Převzato z [25].

Z obrázku 25 je nicméně zřejmé, že chiralita L, L v polohách B26 a B29 referenčního analogu směřuje triazolový můstek ve směru do kavity tvořené mezi α CT peptidem a L1 doménou. Tato kavita je také názorně vidět na obrázku 4A (strana 16). Zdá se, že změna chiralita L za D v obou polohách (B26 i B29) pravděpodobně může směřovat triazolový můstek jinak, možná více směrem k α CT peptidu, což je, zdá se, zvláště v případě polohy B26 nevýhodné zejména pro afinitu vůči oběma isoformám (analogy **1** a **2**). V případě pozice B29 je D konfigurace tolerována oběma isoformami pokud je ovšem v poloze B26 konfigurace L. Analog **3** tak má podobnou afinitu vůči IR-A jako referenční analog s konfigurací L, L, tzn. asi 200% lidského insulinu. Afinita analogu **3** vůči IR-B ovšem poklesla na 400% což je méně, než měl referenční analog (570%). Tím pádem ovšem i IR-B/IR-A specifita analogu **3** je nižší než u referenčního analogu.

Detailní strukturní vysvětlení rozdílů mezi afinitami analogů je ovšem velmi obtížné či spíše nemožné bez znalosti krystalové struktury IR-B isoformy receptoru. Jedině znalost umístění a 12 „extra“ aminokyselin IR-B by mohla přinést opravdu účinný návod pro návrhy analogů insulinu selektivních pro tuto isoformu IR.

I přesto, že se se nepodařilo vytvořit nový ještě více selektivní IR-B analog než byl referenční analog DOI-cyklo[Gly-Phe-Phe-(L-N₃Pent)-Thr-Pro-(L-Prg)-Thr], mohou být naše nová data přínosná pro vývoj nových analogů s potenciálním využitím k léčbě diabetu. Podle výsledků testovaného analogu **3** a analogu z práce Viková a kol. lze předpokládat, že dobrá cesta k vytvoření více selektivních analogů je přemostění (ať už triazolový můstek či jiné) vedoucí z pozice B26 směrem k C-konci B řetězce, přičemž C α konfigurace aminokyseliny v poloze B26 bude v L-formě.

7 Závěr

V této bakalářské práci byly připraveny tři analogy insulínu s triazolovým můstkem v pozicích B26 a B29 na C-konci řetězce B. Tyto analogy se lišili konfigurací atomů C α aminokyselin v těchto polohách. Triazolový můstek byl připraven cykloadiční reakcí katalyzovanou měďnými ionty mezi postranními řetězci kyseliny azidopentanové v pozici B26 a propargylglycinu v pozici B29. Konkrétně byl připraven analog **1** s D-N₃PentB26 a D-PrgB29, analog **2** s D-N₃PentB26 a L-PrgB29 a analog **3** s L-N₃PentB26 a D-PrgB29. Následně byla určena vazebná afinita vůči IR-A a IR-B. Analogy **1** a **2** nevykazovaly žádnou selektivitu ani k jedné isoformě receptoru a jejich afinita k IR byla oproti lidskému insulínu snížena. Analog **3** měl nejvyšší afinitu vůči IR-B (400 % lidského insulínu), jeho afinita k IR-A byla přibližně poloviční (205 %) a v součtu se choval jako mírně (asi 2x) selektivní pro IR-B.

Seznam literatury

- [1] *Abbreviations and Symbols*. Eur. J. Biochem., 1977, **74**(1), s. 1-6.
- [2] BANTING, F. G. *The History of Insulin The Cameron Prize Lecture delivered before the University of Edinburgh*. Edinburgh Medical Journal, 1928, **36**(1), s. 1-18.
- [3] SANGER, F. *Chemistry of Insulin*. Science. 1959, **129**(3359), s. 1340-1344.
- [4] ADAMS, M. J. a ET AL. *Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals*. 224. Nature, 1969, **5217**, s. 491-495.
- [5] ŽÁKOVÁ, L. *Nové insulinové analogy modifikované v C-koncové části B-řetězce*. Disertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, 2004.
- [6] HUML, K. a T. BARTH. *STRUKTURA INZULINU*. Chem. listy, 1998, **93**, s. 294-301.
- [7] ŠKRHA, J. *Diabetologie*. Praha: Galén, 2009.
- [8] JANÍČKOVÁ ŽDÁRSKÁ, D. *Moderní diabetologie*. Praha: Current Media, 2017.
- [9] TALBOT, K., H.-Y. WANG, H. KAZI a ET AL. *Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline*. Journal of Clinical Investigation, 2012, **122**(4), s. 1316-1338.
- [10] POLLAK, M. *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. Nature Reviews Cancer, 2008, **8**(12), s. 915-928.
- [11] MCKERN, N. M., M. C. LAWRENCE, V. A. STRELTSOV a ET AL. *Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation*. Nature, 2006, **443**(7108), s. 218-221.
- [12] HUML, K., L. KLASOVÁ a J. BARTHOVÁ. *INTERAKCE INZULÍNU S INZULÍNOVÝM RECEPTOREM*. Chem. listy, 2002, **96**, s. 698-703.
- [13] JIRÁČEK, J. a L. ŽÁKOVÁ. *Structural Perspectives of Insulin Receptor Isoform-Selective Insulin Analogs*. Frontiers in Endocrinology, 2017, **8**(167).

- [14] BELFIORE, A., F. FRASCA, G. PANDINI, L. SCIACCA a R. VIGNERI. *Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease*. Endocrine Reviews, 2009, **30**(6), s. 586-623.
- [15] VIENBERG, S. G., S. D. BOUMAN, H. SORENSEN a ET AL. *Receptor-isoform-selective insulin analogues give tissue-preferential effects*. Biochemical Journal, 2011, **440**(3), s. 301-308.
- [16] MEYTS, P. *Insulin/receptor binding: The Last piece of the puzzle*. Bioessays, 2015, **37**(4), s. 389-397.
- [17] WARD, C. W., J. G. MENTING a M. C. LAWRENCE. *The insulin receptor changes conformation in unforeseen ways on ligand binding: Sharpening the picture of insulin receptor activation*. BioEssays, 2013, **35**(11), s. 945-954.
- [18] MENTING, J. G., J. WHITTAKER, M. B. MARGETTS a ET AL. *How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor*. Nature, 2013, **493**(7431), s. 241-245.
- [19] MENTING, J. G., Y. YANG, S. J. CHAN a ET AL. *Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, **111**(33), s. 3395-3404.
- [20] MEYTS, P. De. *Insulin and its receptor: structure, function and evolution*. BioEssays, 2004, **26**(12), s. 1351-1362.
- [21] SCAPIN, G., V. DANDEY, Z. ZHANG a et AL. *Structure of the insulin receptor–insulin complex by single-particle cryo-EM analysis*. Nature, 2018, **556**(7699), s. 122-125.
- [22] ZAYKOV, A. N., J. P. MAYER a R. D. DIMARCHI. *Pursuit of a perfect insulin*. Nature Reviews Drug Discovery, 2016, **15**(6), s. 425-439.
- [23] BROŽ, J. a A KOL. *Léčba inzulinem*. Praha: Maxdorf, 2015.
- [24] HERRING, R., R. H. JONES a D. L. RUSSELL-JONES. *Hepatoselectivity and the evolution of insulin*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2014, **16**(1), s. 1-8.

- [25] VIKOVÁ, J., M. COLLINSOVÁ, E. KLETVÍKOVÁ a ET AL. *Ration steering of insulin binding specificity by intra-chain chemical crosslinking*. Scientific Reports, 2016, **6**(1).
- [26] TORNOE, Ch., C. CHRISTENSEN a M. MELDAL. *Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides*. The Journal of Organic Chemistry, 2002, **67**(9), s. 3057-3064.
- [27] ROSTOVTSEV, V. V., L. G. GREEN, V. V. FOKIN a K. B. SHARPLESS. *A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes*. Angew. Chem. Int. Ed., 2002, **41**(14), s. 2596-2599.
- [28] CROLL, Tristan I., Brian J. SMITH, Mai B. MARGETTS, Jonathan WHITTAKER, Michael A. WEISS, Colin W. WARD a Michael C. LAWRENCE. *Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain: Multi-Modal Inclusion of the Insert Domain*. Structure, 2016, **24**(3), s. 469-476.
- [29] LAWRENCE, Michael C, Neil M MCKERN a Colin W WARD. *Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor*. Current Opinion in Structural Biology, 2007, **17**(6), s. 699-705.
- [30] MEYTS, P. De, E. van OBBERGHEN, J. ROTH, A. WOLLMER a D. BRANDENBURG. *Mapping of the residues responsible for the negative cooperativity of the receptor-binding region of insulin*. Nature, 1978, **273**(5663), s. 504-509.
- [31] MEYTS, P. De a J WHITTAKER. *Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design*. Nature Reviews Drug Discovery, 2002, **1**(10), s. 769-783.
- [32] SCHÄFFER, L. *A model for insulin binding to the receptor*. European Journal of Biochemistry, 1994, **221**(3), s. 1127-1132.
- [33] BAKER, E. N., T. BLUNDELL, J. CUTFIELD a ET AL. *The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1.5 Å Resolution*. Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B - Biological Sciences, 1988, **319**(1195), s. 369-456.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka